Спироски М, Трајков Д, Петличковски А,
Ефинска-Младеновска О, Сибиновска О, Христоманова С

ПРАКТИКУМ ЗА ХУМАНА ГЕНЕТИКА-1

Учебник за практична настава од хумана генетика
- второ издание -

Институт за имунобиологија и хумана генетика,
Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј"
Скопје, 2009

АВТОРИ

Проф. д-р Мирко Спироски, асист. д-р Дејан Трајков, асист. д-р Александар Петличковски, биотехнолог Оливија Ефинска-Младеновска, молекуларен биолог Олгица Сибиновска, помл. асист. д-р Славица Христоманова, Институт за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје.

РЕЦЕНЗЕНТИ

Проф. д-р Мирјана Кочова, Универзитетска клиника за детски болести, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје.

Проф. д-р Гордана Адамова, Универзитетска клиника за гинекологија и акушерство, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје.

Проф. д-р Александар Димовски, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје.

CIP - Каталогизација во публикација
Народна и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје

575.1:61(076.5)(075.8)

ПРАКТИКУМ за хумана генетика-1 : учебник за практична настава од хумана генетика / Спироски М., Трајков Д., Петличковски А., Ефинска-Младеновска О., Сибиновска О., Христоманова С. - 2. изд. - Скопје : Медицински факултет, Институт за имунобиологија и хумана генетика, 2009. - 135 стр. : илустр. ; 27 см

Библиографија: стр. 135

ISBN 978-9989-2661-1-9
1. Спироски, Мирко [автор]
а) Хумана генетика - Високошколски учебници - Вежби, лабораториски
COBISS.MK-ID 77801994

© 2009 Институт за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Скопје

Сите права се заштитени. Овој труд не смее да биде преведен или копиран во целина или негов дел без потпишана дозвола од издавачот (Институт за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Скопје). Забрането е било какво складирање и архивирање, електронско прилагодување, компјутерско програмирање или користење со некоја слична или различна технологија позната до денес или која ќе се развие подоцна.

Печати: печатница ПРОпоинт графички центар, Скопје

Тираж: 600 примероци

Прифатен како редовен учебник за практична настава од хумана генетика на 13. Седница на Наставно-научен совет на Медицинскиот факултет во Скопје, одлука број 09-299412 од 29.01.2008 година. Според мислењето на Министерството за култура на Република Македонија за книгата ПРАКТИКУМ ЗА ХУМАНА ГЕНЕТИКА-1 се плаќа повластена даночна стапка.

ПРЕДГОВОР

Предметот хумана генетика за прв пат е воведен со Европскиот кредитен трансфер систем (ЕКТС) на Медицинскиот факултет во Скопје во учебата 2005/2006 година. Предметот се слуша во вториот семестар со вкупен фонд од 60 часови (30 часа теоретски и 30 часа вежби) и се вреднува со 4 кредити. Содржината на предметот е поделена во две функционални целини: Хумана генетика-1, со фонд од 30 часа, во која се изнесуваат основите на хумана генетика и Хумана генетика-2, со фонд од 30 часа, во која се изнесуваат генетски аспекти на болестите кај човекот, нивното дијагностицирање и лекување.

Во овој практикум за Хумана генетика-1 внесени се текстови од 15 вежби, групирани во пет блока од по три вежби. На почетокот од блоковите се дадени учебните цели за секоја одделна вежба и поените кои ги носат присуството на вежбите и стекнатото знаење од нив.

Во секоја вежба даден е обемен материјал кој е поврзан со изведувањето на соодветната вежба, главно заради недостаток од соодветни печатени материјали на македонски јазик за нивно разбирање. На крајот од секоја вежба дадени се неколку задачи кои треба секој студент да ги изведе, а во соодветните простори да внесе дел од резултатите кој ги добил. На тој начин студентите можат да се присетуваат на изведувањето на вежбите во текот на нивното учење.

Со воведување насока за Високи стручни школи на Медицинскиот факултет во Скопје, воведен е предметот Хумана генетика за медицински сестри со фонд на часови 15+0, како и за логопеди со фонд на часови 30+30. Овој практикум е наменет за практичната настава за логопеди, со скратување на 5 вежби (по една вежба од секој блок).

Првото издание на Практикумот за хумана генетика-1 беше отпечатено во 2006 година. Забелешките од рецензентите и од студентите се делумно вградени во ова издание. Очекуваме студентите да дадат дополнителни забелешки за подобрување содрижината и текстот на овој практикум.

Се надевам дека практикумот ќе им помогне на студентите да ги совладаат вежбите од Хумана генетика-1.

Проф. д-р Мирко Стироски

Скопје, 2009 година

СОДРЖИНА

БЛОК 1 7

ВЕЖБА 1. ИЗОЛАЦИЈА НА ГЕНОМСКА ДНК 9
1.1. Вовед 9
1.2. Изолирање ДНК од полна крв со фенол-хлороформ 10
1.2.1. Приготвување раствори 10
1.2.2. Протокол за изолација на ДНК 12
1.2.3. Одредување интактноста на ДНК 15
1.3. Задача 16

ВЕЖБА 2. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈА НА ДНК, РНК И ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ 13
2.1. Вовед 15
2.2. Приготвување на инструментот и мерење 16
2.3. Мерење на примерок 17
2.4. Определување на концентрација на растворена ДНК со GeneQuant pro 18
2.5. Задача 18

ВЕЖБА 3. ПОЛИМЕРАЗНО ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА (ПВР) 20
3.1. Вовед 20
3.2. Компоненти на стандардниот ПВР протокол 20
3.3. Механизам на ПВР 21
3.4. Потребно за изведување 24
3.5. Изведување 24
3.5.1. Претходна подготовка во мраз 24
3.5.2. Стандарден ПВР протокол 24
3.6. Проверка на ПВР продуктот 26
3.7. Амплификација на целиот геном 27
3.7.1. ПВР со дегенерирани олигонуклеотидни започнувачи 27
3.7.2. Амплификација со повеќекратно изместување (Multiple displacement amplification = MDA) 27
3.8. Други форми на ПВР 27
3.9. Задачи 29
3.9.1. Да се изведе ПВР амплификација на егзоните 2 и 3 од гените на ХЛА-класа 1 за локусите ХЛА -А, -Б и -Ц со биотинилирани започнувачи 29
3.9.2. Да се провери присуството и точноста на ПВР продуктот на агарозна гел електрофореза 30

БЛОК2 31

ВЕЖБА 4. ИЗОЛАЦИЈА НА РНК И РЕВЕРЗНА ТРАНСКРИПЦИЈА НА ПВР (РТ-ПВР) 33
4.1. Вовед 33
4.2. Изолација на РНК 33
4.2.1. Изолација на РНК од лимфоцити/ леукоцити од периферна крв или солидно ткиво со употреба на Тризол 34
4.3. Изолација на РНК со раствор Д 34
4.4. ДЕПК третирана вода 35
4.5. Определување концентрацијата на РНК 35
4.6. Електрофореза на РНК 35
4.7. Реверзна транскрипција на полимеразно верижна реакција (РТ-ПВР) 36
4.7.1. Синтеза на првата верига 37
4.8. ПВР 38
4.9. Задачи 38
4.9.1. Анализа на експресијата на ИЛ-6 и ИЛ-12 мРНК по стимулација со ЛПС или ЕМЦВ во нормални фибробласти и фибробласти нокаути за протеин киназа ПКР 38

ВЕЖБА 5. ДОЛЖИНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ НА РЕСТРИКЦИСКИ ФРАГМЕНТИ (ДПРФ) 40
5.1. Вовед 40
5.2. Рестрикциски ендонуклеази 40
5.2.1. Места на сечење 41
5.2.2. Комплементарност на фрагментите и поврзување 41
5.2.3. Рестриктивни ензими како алатка 42
5.2.4. Видови рестриктивни ензими 42
5.2.5. Именување 42
5.2.6. Примери 43
5.3. Изведување на вежбата 43
5.3.1. Потребен материјал.....43
5.3.2. Стандарден протокол 43
5.4. Примени 44
5.4.1. Детекција на точкасти мутации со ДПРФ или ПВР амплифицирана ДНК секвенца 44
5.4.2. Докажување на татковство 44
5.4.3. Анализа на наследување на болести 44
5.5. Задачи 46
5.5.1. Да се одредат мутациите на C282Y за хемохроматоза со ДПРФ 46
5.5.2. Толкување на резултатите 47

ВЕЖБА 6. ССП (SEQUENCE-SPECIFIC PRIMING) МЕТОД 48
6.1. Вовед 48
6.2. Електрофореза на ДНК фрагменти 50
6.2.1. Општо за електрофореза 50
6.3. Изведување на вежбата 52
6.3.1. ССП метод 52
6.3.2. Агарозна гел електрофореза 53
6.4. Задача 56

БЛОК 3 57

ВЕЖБА 7: МЕТОД НА РЕВЕРЗНА ХИБРИДИЗАЦИЈА (REVERSE LINE STRIP - RLS) 59
7.1. Вовед 59
7.2. Дефиниција на молекулската хибридизација 59
7.3. Фактори кои влијаат врз хибридизација на нуклеинските киселини 60
7.4. Денатурација и точка на расплетување (melting point) 60
7.5. Кинетиката на повторно поврзување на ДНК нишките се дефинира како продукт од концентрацијата на ДНК и времето ($C_o t$) 62
7.6. Нуклеински проби 62
7.7. ДНК дамчеста (блот) хибридизација 63
7.8. РНК дамчеста (блот) хибридизација 63
7.9. Методи и апликации на молекулската хибридизација 63
7.10. Метод на реверзна хибридизација 64
7.10.1. Изведување на вежбата 64
7.11. Задача 66

ВЕЖБА 8: ИСПИТУВАЊЕ ГЕНСКО ПРИКАЖУВАЊЕ СО ВЕСТЕРНОВИ ДАМКИ 67
8.1. Општо за Вестерновото дамкосување (blotting) 67
8.2. Пренесување протеините на мембрана 68
8.3. Блокирање на неспецифичните врзувачки места.....68
8.4. Плакнење 68
8.5. Првични и вторични противтела 69
8.6. Потребно за изведување 69
8.6.1. Потребна апаратура 69
8.6.2. Потребни реагенси 69
8.7. Општ протокол за Вестерново дамкосување 69
8.7.1. Дамкосување на протеините 69
8.7.2. Блокирање на мембраната и инкубации со противтела 69
8.7.3. Откривање на протеините 70
8.8. Задачи за студентот 70
8.8.1. Анализа на промените во експресијата на различните регулатори од клеточниот циклус по стимулација со имуностимулаторни ДНК секвенци 70
8.8.2. Анализа на промените во експресијата

на поли (АДП рибоза) полимеразата (PARP) кај клеточната линија Јуркат (JPX-9) по инкубација со цинк, односно кадмиум 70

ВЕЖБА 9: ПРИКАЖУВАЊЕ ТУМОРСКИ МОЛЕКУЛИ - ПРОСТАТЕН СПЕЦИФИЧЕН ПРОТИВГЕН (ПСА) 72
9.1. Општо за малигните обележувачи (маркери) 72
9.2. Генетика на ракот на простата 73
9.3. ПСА (prostate-specific antigen) 73
9.4. Изведување на вежбата 75
9.4.1. Потребен материјал за изведување на вежбата 75
9.4.2. Припрема на пуфер за плакнење (pH7.....75
9.4.3. Припрема на раствор на детектирачки п ротив-вкупен-PSA-Sm/против-слободен-PSA-Eu противтела 76
9.4.4. Примерок 76
9.4.5. Протокол за работа 76
9.4.6. Нормални вредности 78
9.5. Задача 78

БЛОК 4 79

ВЕЖБА 10: АВТОМАТСКО ФЛУОРЕСЦЕНТНО СЕКВЕНЦИОНИРАЊЕ НА ДНК 81
10.1. Општи принципи 81
10.2. Полимеразно верижна реакција (ПВР) 83
10.3. Секвенционирање 83
10.3.1. Секвенционирање на цврста фаза 83
10.3.2. Денатуирирачка полиакриламид гел електрофореза 84
10.4. Задачи за студентот 86

ВЕЖБА 11: ОПРЕДЕЛУВАЊЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СО МОЛЕКУЛСКИ МЕТОДИ 88
11.1. Вовед 88
11.2. Молекулско определување полиморфизам на цитокините 88
11.2.1. Потребно за работа 89
11.2.2. Услови за топлотно циклирање 89
11.2.3. Протокол за работа 89
11.2.4. Толкување на резултатите 90
11.3. Полиморфизам на гените за КИР (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor) 90
11.3.1. Вовед 90
11.3.2. Означување (номенклатура) на КИР 90
11.3.3. Егзон-интрон структура на КИР гените 91
11.3.4. Редослед на КИР гените и хаплотипска варијабилност 92
11.3.5. Потребно за работа 92
11.3.6. Услови за топлотно циклирање 92
11.3.7. Протокол за работа 93
11.3.8. Толкување на резултатите 93
11.4. Задачи 94
11.4.1. Определи го цитокинскиот полиморфизам од дадена фотографија 94
11.4.2. Определи го полиморфизмот на КИР рецептори од дадена фотографија 96

ВЕЖБА 12: ОПРЕДЕЛУВАЊЕ МУТАЦИИ СО МОЛЕКУЛСКИ МЕТОДИ 99
12.1. Вовед 99
12.2. Методи за откривање мутаци 100
12.3. Откривање познати мутации 100
12.3.1. Откривање мутации на МТХФР (Methylentetrahydrofolate reductase) 100
12.4. Откривање непознати мутации 101
12.4.1. Секвенционирање на рет прото-онкоген за анализа на мутации 101
12.4.2. Секвенционирање на тп53 генот за анализа на мутации 101
12.5. Задачи за студентот 102
12.5.1. Да се испитаат мутациите на гените поврзани со кардиоваскуларниот систем 102
12.5.2. Да се анализираат секвенците од различни егзони на *рет* прото-онкогенот и *тп53* генот и да се откријат нивните мутации софтверот Mutation Analyser 104

БЛОК 5 107

ВЕЖБА 13: СОЗДАВАЊЕ РАЗЛИЧИЕ ВО ПОПУЛАЦИЈА (ПОПУЛАЦИСКА ГЕНЕТИКА) 109
13.1. Вовед 109
13.1.1. Зошто ни требаат модели за популации и за молекули? 109
13.2. Харди Вајнбергова рамнотежа (ХВР) 109
13.2.1. Претпоставки за Харди-Вајнбергова рамнотежа.....110
13.2.2. Импликации од Харди-Вајнберговатa рамнотежа 110
13.2.3. Некои концепти значајни за Харди-Вајнберговатa рамнотежа 111
13.3. Откривање селекција со користење податоци од ДНК полиморфизам 111
13.4. Задачи 112
13.4.1. Да се направи анализа на алелската фреквенција на ХЛА-ДРБ1 локусот со компјутерскиот програм Arlequin 112

ВЕЖБА 14: КВАНТИТАТИВНА ГЕНЕТИКА (ГЕНЕТСКА ЕПИДЕМИОЛОГИЈА) 115
14.1. Вовед 115
14.2. Особености на болеста: Описна епидемиологија 116
14.3. Фамилно групирање: Фамилни агрегациски студии 116
14.4. Генетика или околина: Близнаци/посвоени/ полу-наследниц/миграции 117
14.5. Начин на наследување: Сегрегациска анализа 117
14.6. Локуси подложни на болест: Анализи на поврзување 117
14.7. Обележувачи подложни на болест: Асоцијациски студии 118
14.7.1. Статистичка анализа на асоцијација на алел со болест врз основа на популација 118
14.7.2. Статистичка анализа на асоцијација на алел со болест врз основа на фамилни податоци 120
14.7.3. Генетска епидемиологија на комплексните заболувања..... 121
14.8. Задачи 121
14.8.1. Асоцијација на цитокинскиот полиморфизам со бронхијална астма врз основа на популација.....121

ВЕЖБА 15: ЕВОЛУЦИСКА ГЕНЕТИКА 123
15.1. Вовед 123
15.2. Потекло на видовите 123
15.3. Биолошки вид е група од репродуктивно изолирани единки 124
15.4. Дивергентната еволуција може да биде алопатрична, парапатрична или симпатрична 124
15.5. Молекулска еволуција 125
15.5.1. Хомологните гени настануваат од заеднички претходен ген 125
15.5.2. Варијациите во генските секвенци и конструирање филогенетски стебла 126
15.5.3. Анализирање поранешна ДНК 128
15.5.4. Генетски варијации со неутрални промени во генските секвенци.....128
15.5.5. Еволутивно менување на хромозомската структура и број 129
15.6. Задачи 130
15.6.1. Пресметување филогенетско стебло на ХЛА-ДРБ1 локусот кај различни популации со методот на оддалеченост 130
ЛИТЕРАТУРА 134

БЛОК 1

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 1. ИЗОЛАЦИЈА НА ГЕНОМСКА ДНК

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- изолираат геномска ДНК од периферна крв;
- проверат интактност на геномска ДНК.

ВЕЖБА 2. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈА НА ДНК, РНК И ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- измерат концентрации на ДНК, РНК и олигонуклеотиди;
- проверат чистота на изолираната ДНК, РНК и олигонуклеотиди.

ВЕЖБА 3. ПОЛИМЕРАЗНО ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА (ПВР)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- изведат ПВР на егзоните 2 и 3 од гените на ХЛА-класа 1 за локусите ХЛА -А, -Б и -Ц со биотинилирани започнувачи (прајмери);
- проверат присуство и точност на ПВР продуктот на агарозна гел електрофореза.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	0.50 поени
ЗНАЕЊЕ	2.50 поени
ВКУПНО:	3.00 поени

ВЕЖБА 1. ИЗОЛАЦИЈА НА ГЕНОМСКА ДНК

1.1. Вовед

Кај различните животински и растителни видови, само мал дел од вкупната ДНК (геном) кодира некаков протеин. На пример, со *Проектот за хуманиот геном* од вкупно 3 милијарди базни пара кои го сочинуваат човечкиот геном дефинирани се 20000-25000 гени и само 1,5% од вкупната ДНК отпаѓаат на протеин кодирачки егзони. Значењето на останатиот дел се уште не е разјаснето.

Постојат неколку методи за изолирање на ДНК кои се погодни за различни појдовни материјали. Изолирањето на геномска ДНК не е тешка постапка, но за да може понатаму да се користи изолираната ДНК мора да биде со голема молекулска тежина т.е. неоштетена.

Изолацијата на геномска ДНК со примена на протеиназа К, детергент СДС (натриум додецил сулфат) и фенол е еден од најпри-менуваните методи за изолација кој обезбедува голем принос. Протеиназата К и СДС го растворaат примерокот и ја дигестираат протеинската компонента без притоа да делуваат на ДНК. Примерокот потоа се екстрахира со денатуранси на протеините (фенол-хлороформ) а од останатиот воден раствор ДНК-та се преципитира со абсолутен етанол и раствор на амониум ацетат.

Генерално, колку помалку се манипулира со ДНК толку нејзиниот квалитет на крај е подобар, но некои стапки не смее да се прескокнат. Геномска ДНК може да се изолира од клетки или ткива по нивно раскинување, а врз основа на различните карактеристики кои ги имаат ДНК, проте-инските и останатите конституенси. Различните хемикалии кои се користат за изолирање на геномска ДНК треба да бидат со највисок можен квалитет, исто како и водата која се користи за спремање на потребните раствори.

1.2. Изолирање ДНК од полна крв со фенол-хлороформ

1.2.1. Приготвување раствори

1.2.1.1. Раствор 1 (Ретикулоцитен раствор).

Ретикулоцитниот раствор се приготвува како 5 пати концентриран раствор (за чување):

NaCl	*40,9 г*	
KCl	*1,85 г*	
MgCl x 12 H_2O	*7,10 г*	*или*
MgCl x 6 H_2O	*4,80 г*	
дд H_2O	*до 1000 мЛ*	

200 мЛ од растворот за чување се разредуваат до 1000 мЛ со дд H_2O.

1.2.1.2. Раствор 2 (Раствор за лизирање еритроцити)

Растворот за лизирање на еритроцитите се приготвува свеж:

131 mM NH_4Cl	*7,14 г*	*3,5 г*
0,9 mM NH_4HCO_3	*0,07 г*	*35 мг*
дд H_2O	*до 1000 мЛ*	*до 500 мЛ*

1.2.1.3. Раствор 3 (СТЕ пуфер)

0,1 M NaCl	*5,844 г*
0,05 M Tris	*6,057 г*

1 mM EDTA	*0,3722 г*
дд H_2O	*до 1000 мЛ*
pH со HCl	*7,4*

Овој раствор треба да се стерилизира (автоклав или на 100^{0}C) и се чува на +4^{0}C.

1.2.1.4. Раствор 4 (10% СДС (натриум додецил сулфат))

SDS	*10,0 г*
дд H_2O	*до 100 мЛ*

1.2.1.5. Раствор 5 (Протеиназа К)

Протеиназата К се припрема како 10 мг/мЛ раствор во стерилна вода или Tris пуфер, на пример, 100 мг протеиназа К се растворааат во 10 мЛ стерилна вода или Tris пуфер. Основниот раствор се распределува во тубички од 1,5 мЛ. Растворот на протеиназа К се чува на - 20^{0}C.

10 mM Tris	*1,2214 г*
дд H_2O	*до 1000 мЛ*
pH со HCl	*7,4*

1.2.1.6. Раствор 6 (Заситен фенол)

Се растопува 1 кг фенол во водено купатило (на 65-85^{0}C). Во растопениот фенол се додава 1 г 8-хидроксиквинолин.

Се припремаат 2 Л 1 М Tris (242,2 г Tris до 2 Л дд H_2O, pH 8,3-8,4 се дотерува со HCl).

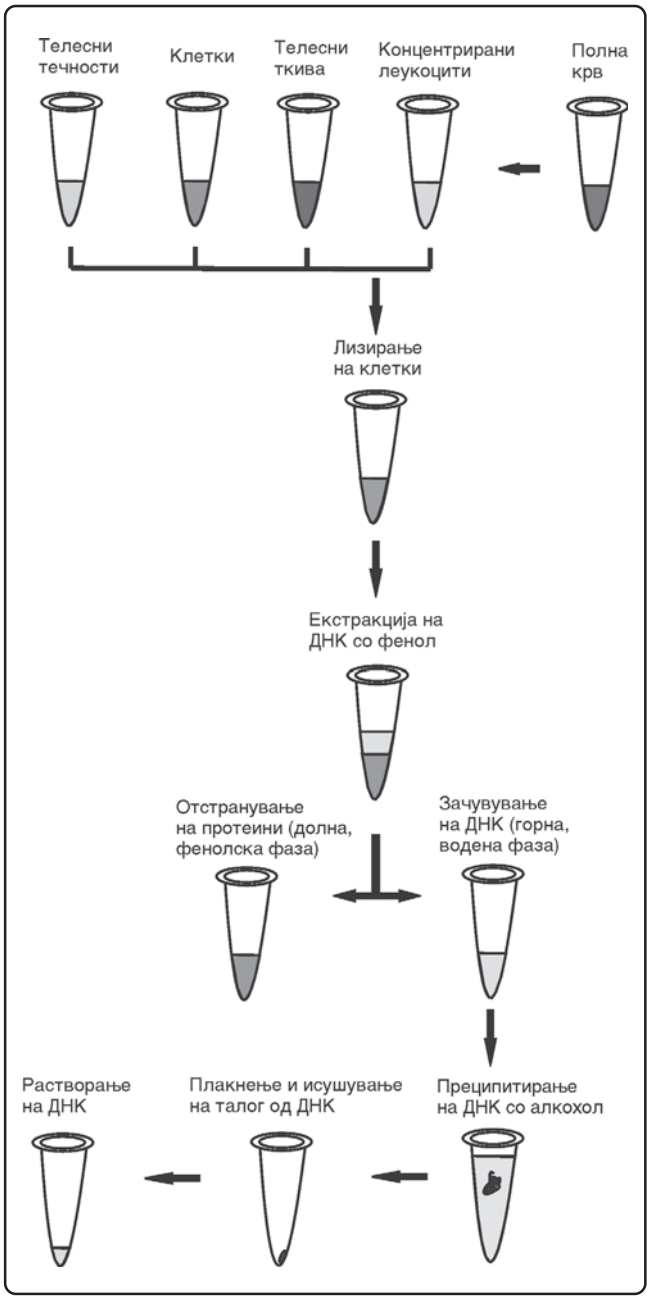
Се припрема 2 Л 0,1 М Tris (200 мЛ од 1 М Tris, до 2 Л дд H_2O).

Растопениот фенол се префрла во поголемо шише (чаша), се додава половина од припремениот волумен 1 М Tris, и се остава да се меша 30-45 мин. Се прекинува мешањето и се остава да се издвојат двата слоја. Се аспирира супернатантот и се додава останатиот волумен 1 М Tris. Се меша 30-45 мин, се аспирира супернатантот. Се додава половина од волуменот 0,1 М Tris. Се меша 30-45 мин, се аспирира супернатантот. Во преостанатиот волумен 0,1 М Tris се додаваат 2 мЛ бета-меркаптоетанол, и овој волумен се додава на фенолот. Се меша 30-45 мин, се остава да се издвојат двата слоја и се аспирира половина од волуменот на супернатантот. Се зема примерок од фенолната фаза и се проверува pH (треба да е 8,4-8,5). Заситениот фенол се чува на +4^{0}C, во темно шише.

1.2.1.7. Раствор 7 (Хлороформ-изоамилалкохол)

Се мешаат хлороформ и изоамилалкохол во однос 24 :1.

хлороформ	*480 мЛ*
изоамилалкохол	*20 мЛ*



Слика 1.1: Шематски приказ на изолацијата геномска ДНК од полна крв со методот фенол-хлороформ.

Растворот се чува на +4^{0}C, во темно шише.

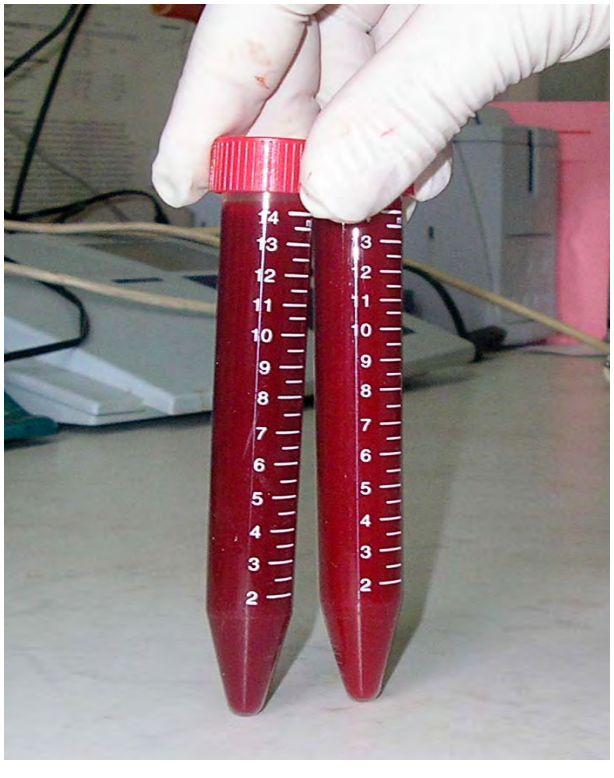
1.2.1.8. Раствор 8 (ТЕ пуфер)

10 mM Tris	*1,2114 г*
1 mM EDTA	*0,37224 г*
дд H_2O	*до 1000 мЛ*
pH со HCl	*7,5*

Растворот се стерилизира на 100^{0}C или се автоклавира.

1.2.2. Протокол за изолација на ДНК

Примерокот 3 мЛ крв се добива со внимателна венепункција, во вакумизирана епруветка која содржи антикоагуланс ЕДТА. Најдобро е примерокот полна крв да се обработува уште истиот ден (доколку понатамошната обработка се одложува, примерокот крв може да се чува на +4^{0}Ц).



Слика 1.2: Чекор 1, плакнење на клетките со ретикулоцитен раствор.

1.2.2.1. Издвојување леукоцити од периферна крв по лизирање на еритроцитите

Чекор 1. Примерокот полна крв се префрла квантитативно во пластична туба од 15 мЛ, и се дополнува со ретикулоцитен раствор *(раствор 1)* до 10-14 мЛ. Клетките се мијат со ретикулоцитниот раствор 10 мин со рачно мешање на тубата или на мешалка (Слика 1.2).

Чекор 2. Тубите се центрифугираат на 1800 (до 2500) ввм, 10 мин, на +4^{0}Ц, по што клетките се добиваат во талогот. Талогот ги содржи и леукоцитите и еритроцитите. Суперна-тантот треба да е бистар, освен ако не се појавила спонтана хемолиза во примерокот крв кој стоел подолго време на +4^{0}Ц (Слика 1.3).

Чекор 3. Со вакуум се аспирира супернатантот (Слика

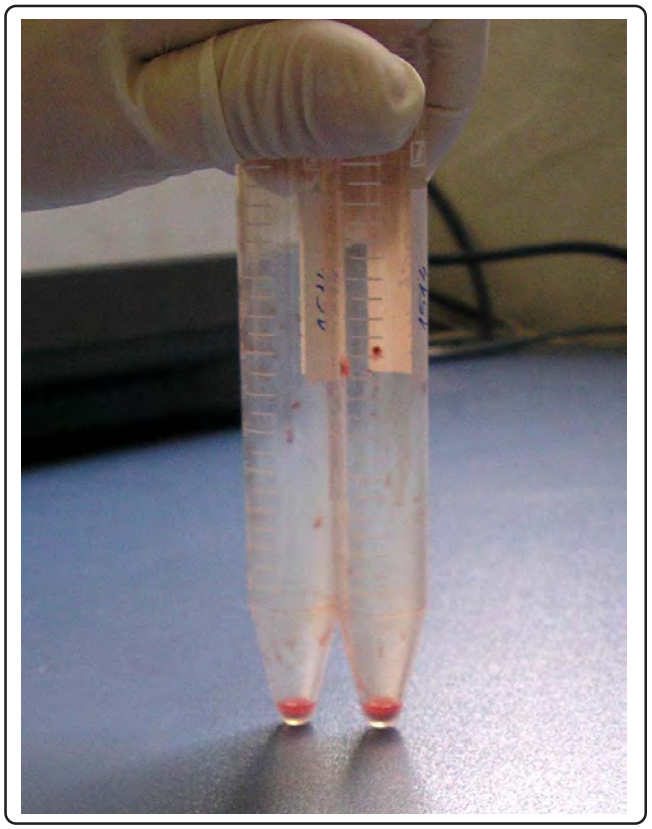


Слика 1.3: Чекор 2 и 3, аспирирање на супернатантот после плакнење со ретикулоцитен раствор.

1.3), и на клетките во талогот им се додава раствор за лизирање на еритроцитите *(раствор 2)*, до вкупен волумен од 10-14 мЛ. Тубата се промешува убаво за да се одлепат клетките во талогот од дното на тубата.

Чекор 4. Тубите се мешаат рачно или на мешалка, 10 мин, при што доаѓа до лизирање на еритроцитите. Лизирањето треба да се продолжи се додека супернатантот не се избистри (да добие лакирана боја или боја на вино).

Чекор 5. Тубите се центрифугираат на 1800 (до 2500) ввм, 10 мин, на +4^{0}Ц, по што се добива видлив бел талог кој ги содржи леукоцитите (Слика 1.4).



Слика 1.4: Чекор 5 и 6, талог од леукоцити.

Чекор 6. Со вакуум се аспирира супернатантот, се внимава да не се аспирираат леукоцитите (Слика 1.4).

Чекор 7. Доколку во талогот се добие црвен прстен од нелизирани еритроцити, чекорите од 4 до 6 се повторуваат уште еднаш. По додавањето на растворот за лизирање тубата се промешува за да се одлепат леукоцитите и нелизираните еритроцити во талогот од дното на тубата.

1.2.2.2. Дигестија на леукоцитите со протеиназа К

На талогот леукоцити му се додава смеса од:

- 5 мЛ СТЕ пуфер *(раствор 3)*
- 250 мкЛ 10% СДС *(раствор 4)* и
- 50 до 100 мкЛ пртеиназа К *(раствор 5)*.

Се промешува тубата со потчукнување на дното за да се одлепат леукоцитите. Материјалот се меша нежно рачно, додека да се раствори талогот од леукоцити. Смесата се остава на 37^{0}Ц преку ноќ (инкубацијата може да се продолжи и подолго, доколку леукоцитите утредента не се сеуште дигестирани). Ако утредента материјалот е многу вискозен, се додава од СТЕ пуферот, се раскршува воскозниот материјал со пипета и инкубацијата се продолжува уште неколку часа.

1.2.2.3. Фенол-хлороформна екстракција на ДНК

Чекор 1. Во материјалот се додава еднаков волумен (5 мЛ) заситен фенол *(раствор 6)*.

Чекор 2. Смесата се меша нежно, рачно или на мешалка, 10 мин.

Чекор 3. Епруветката се остава 10 мин во гранули мраз (0^{0}Ц).

Чекор 4. Материјалот се центрифугира на 4000 ввм, 10 мин, на +4^{0}Ц (Слика 1.5А).

Чекор 5. Водениот слој (супернатантот) се префрла со пипетор во епруветка од 15 мЛ.

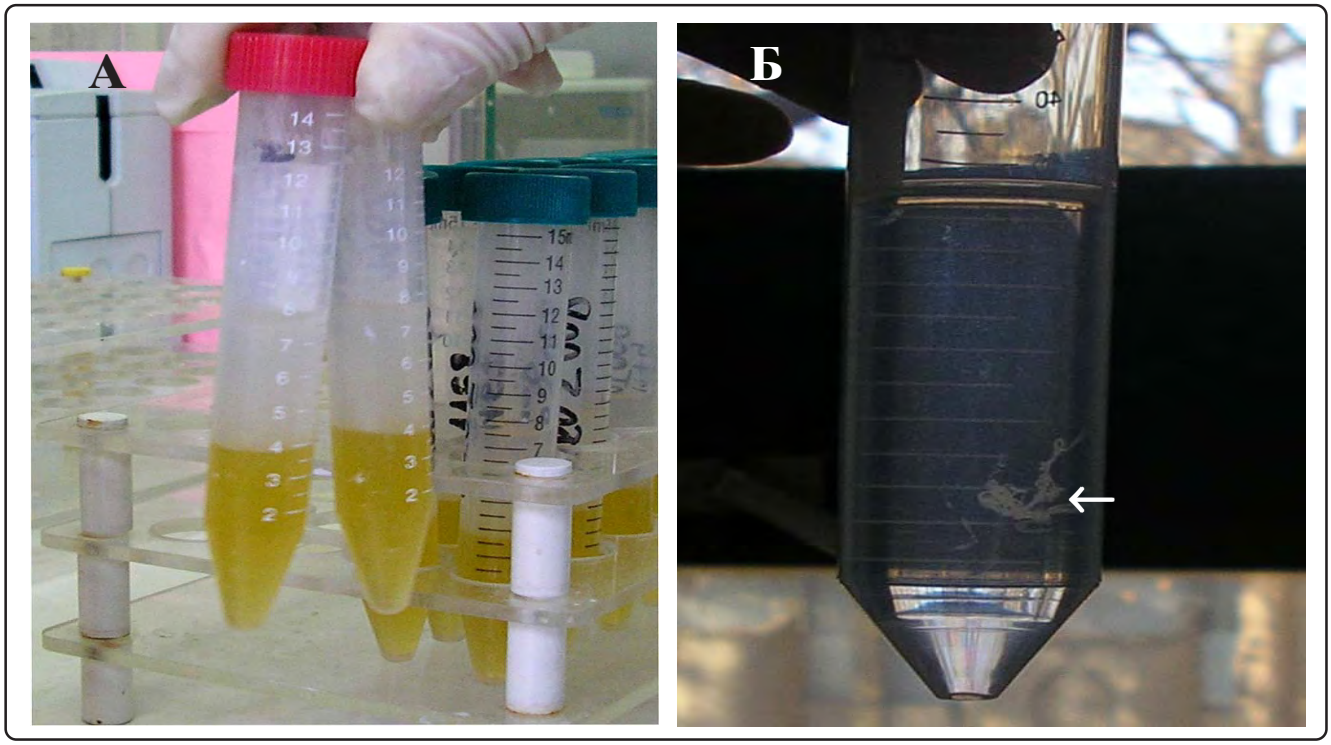
Чекор 6. Чекорите од 1 до 5 се повторуваат уште еднаш.

Чекор 7. Во издвоениот супернатант се додава ист волумен (5 мЛ) смеса хлороформ-изоамил алкохол *(раствор 7)*.

Чекор 8. Се повторуваат чекорите од 1 до 5, супернатантот се префрла со пипетор во 50 мЛ туба.

1.2.2.4. Преципитација на ДНК со апсолутен етил алкохол

Чекор 1. Во 50 мЛ туба се додава апсолутен етил алкохол (претходно изладен на -20^{0}Ц), при што ДНК веднаш почнува да преципитира. Тубата се промешува неколку пати, додека да ги снема меурчињата од преципитираната ДНК. Добро преципитираната ДНК е во вид на бел конец кој се издигнува на површината од епруветата (Слика 1.5Б). Ако преци-питацијата е



Слика 1.5: А, чекор 4, раздвојување во две фази: долна фенолна и горна водена (која ја содржи ДНК). Б, Исталожена (преципитирана) ДНК со апсолутен алкохол (стрелка).

бавна, или ако не се добива видливо облаче од преципитирачка ДНК, тубата се остава на -20^{0}Ц неколку часа, а потоа се проверува.

1.2.2.5. Миење на преципитираната ДНК

Чекор 1. Преципитираната ДНК внимателно се префрла со пипетор во тубичка од 1,5 мЛ.

Чекор 2. Се додава 1 мЛ 70% етил алкохол, и тубичката се промешува неколку пати.

Чекор 3. Тубичката се центрифугира на 12 000 ввм, 5 мин. Преципитираната ДНК се добива во вид на бел талог во тубичката.

Чекор 4. Се отстранува супернатантот (или се извлекува со пипетор, или се истура од тубичката), внимателно, за да не се изгуби и талогот.

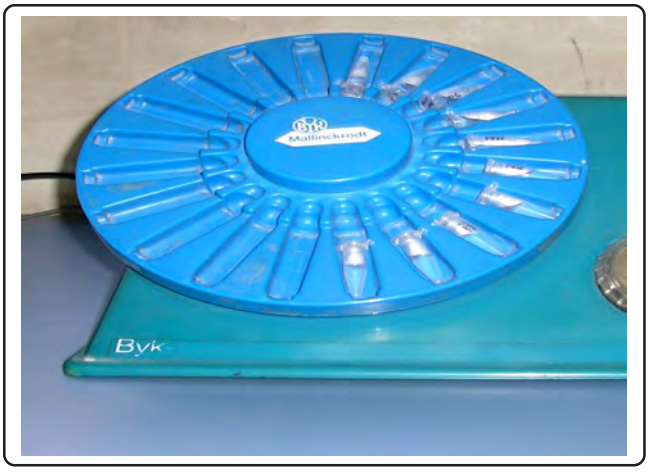
Чекор 5. Чекорите од 2 до 4 се повторуваат уште 1-2 пати. По последното миење со 70% етил алкохол, тубичката се остава отворена да се исуши.

1.2.2.6. Растворање на ДНК

Чекор 1. Во тубичката се додава 1мЛ стерилна вода (од ампула) или ТЕ пуфер *(раствор 8).*

Чекор 2. Тубичката се промешува за да се одвои талогот.

Чекор 3. За потполно растворање на ДНК тубичката се остава преку ноќ на 37^{0}Ц или на мешалка (Слика 1.6).



Слика 1.6: Растворање на ДНК со нежно мешање на полувертикален мешач.

1.2.3. Одредување интактноста на ДНК

Се припрема 0,8% агарозен гел. Жлебовите во гелот се полнат со смеса која се припрема со 1 мкЛ ДНК растворен со 10 мкЛ дд H_2O и 3-5 мкЛ боја (оранж Г).

1.3. Задача

Направи електрофореза на изолирана геномска ДНК на агарозен гел, направи фотографија, залепи ја на предви-деното место (Слика 1.7) и протолкувај ја интактноста на изолираната ДНК.

Толкување:

_____

_____

_____

Слика 1.7: Формулар за внесување фотографија од гел електрофореза на изолирана геномска ДНК.

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

ВЕЖБА 2. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈА НА ДНК, РНК И ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ

2.1. Вовед

По екстракцијата на нуклеинските киселини потребна е проверка на нивната концентрација и чистота бидејќи е можно во изолатот да се присутни и други примеси (најчесто протеини или фенол) кои можат да влијаат врз резултатот од последователните молекулски анализи.

За одредување концентрацијата на раствори на нуклеинските киселини (ДНК и РНК) или пак олигонуклеотиди најчесто се користи спектрофотометриски метод. Во последниве години, на пазарот се достапни специјализирани апарати (спектрофотометри комбинирани со калкулатори) за определување концентрација и чистота на ДНК/РНК раствори. Во оваа вежба се користи GeneQuant pro RNA/DNA Calculator од фирмата AmershamPharmaciaBiotech (Слика 2.1).

Бидејќи азотните бази апсорбираат УВ светло, постои линеарна зависност помеѓу концентрацијата на ДНК, на пример, и апсорбанцата на УВ, па колку поконцентриран е примерокот, толку поголема ќе биде апсорбанцата за УВ. Апсорбанцата на ултравиолетната светлина за нуклеинските киселини е со максимална вредност за бранова должина од 260 нм, а за протеините 280 нм, па односот апсорбанца 260/280 може да се користи како приближен показател за чистотата на изолираните нуклеински киселини. Доколку овој однос е поголем од 1,8 за ДНК односно од 2 за РНК, се работи за релативно чист примерок. Колку тој однос е помал толку примесата на протеини е поголема во примерокот. Важно е да се напомене дека оваа постапка овозможува приближно определување чистотата на нуклеинските киселини.

Имајќи предвид дека чист раствор од двоверижна



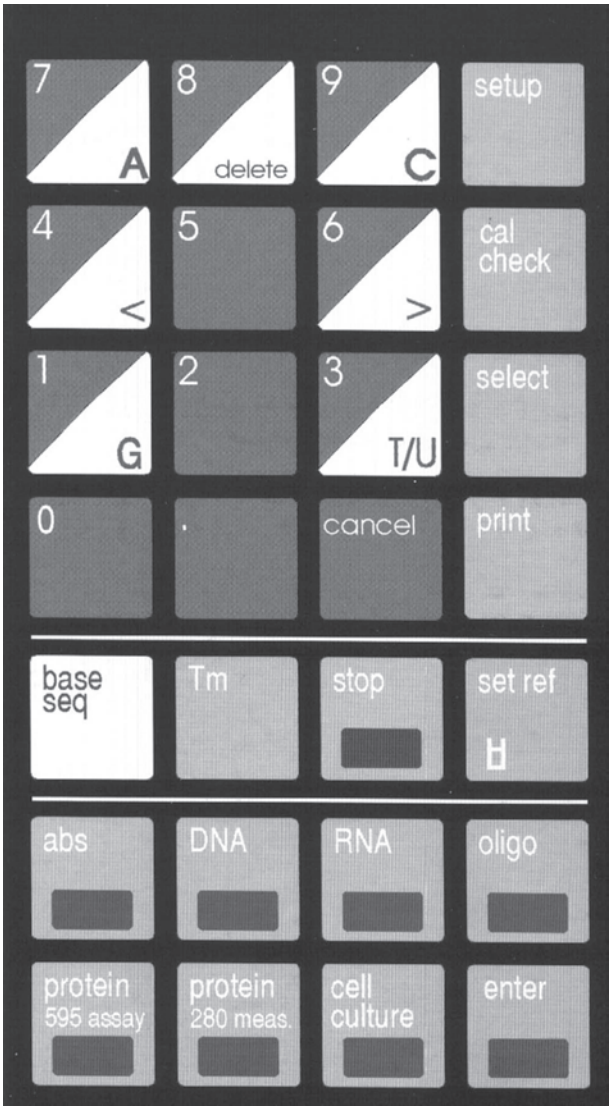
Слика 2.1: Компјутеризиран систем за мерење концентрациите на ДНК, РНК и/или ампликоните со GeneQuant pro RNA/DNA Calculator од фирмата AmershamPharmaciaBiotech.

ДНК со апсорбанца A_{260} = 1 има концентрација од 50 мкг/мЛ (микрограми по мили литар), лесно може да се пресмета концентрација на непознат ДНК раствор. За РНК и едноверижна ДНК, A_{260} е 40 мкг/мЛ, а ако се работи за олигонуклеотиди тогаш A_{260} е 33 мкг/мЛ. Концентрацијата на ДНК или РНК примероците се пресметува според следната формула:

ДНК концентрација (мкг/мЛ) = измерена ОД $_{260}$ х фактор на разредување х 50 мкг ДНК/мЛ
(1 $ОД_{260}$ единица)

РНК концентрација (мкг/мЛ) = измерена ОД $_{260}$ х фактор на разредување х 40 мкг РНК/мЛ
(1 $ОД_{260}$ единица)

при што ОД = оптичка густина (дензитет)



Слика 2.2: Тастатурата на апаратот GeneQuant pro RNA/DNA Calculator од фирмата Amersham Pharmacia-Biotech.

2.2. Приготвување на инструментот и мерење

GeneQuant pro RNA/DNA Calculator апаратот е поврзан со соодветен кабел на серискатa порта од персонален компјутер, а специјалниот софтвер за пресметување (Biochrom) ги внесува отчитаните вредности директно во Ексцел програмот, ги пресметува и ги складира резултатите.

Приготвување на инструментот и мерењето се управува од тастатурата на апаратот GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Слика 2.2).

- По вклучувањето, за приготвување на апаратот се притиснува копчето **“set up”**. За одбирање на специфичните параметри за различни мерења (ДНК, РНК или олигонуклеотиди) прво се одбира соодветното копче **“DNA”, “RNA”** или **“oligo”** соодветно, а потоа копчето **“set up”**.

- Се притиснува копчето **“select”** и **“enter”** за да се минува низ понудените опции.

- Со притиснување на копчето **“stop”** во било кое време, апаратот се враќа во состојба на готовност или се враќа едно ниво погоре во менито.

Day	се впишува датата.
Month	се одбира соодветниот месец.
Year	се впишува годината.
Sample No.	се впишува саканиот број по што секој следен примерок го добива следниот број.
Output Mode	се одбира **printer, serial** или **none**.
AutoPrint	се одбира **on** (за автоматско печатење на резултатот) или **off**.
Survey Scan	се одбира **on, off** или **print,** важи само за модот нуклеински киселини.
Language	се одбира еден од јазиците.

Use Date	се одбира **on** или **off, off** значи дека датата нема да се печати.
Key Click	се одбира **on** или **off**.
Pathlength	се одбира 10, 5, 2, 1 или 0.5 мм.
Units	се одбира единица во која ќе се изразува концентрацијата од мкг/мЛ, нг/мкЛ, мкг/мкЛ.
Use 320 nm	се одбира **yes** или **no**.
Dilution Factor	се одбира факторот на разредување, ранг 1-1000.
одбира	Во специјалниот слот се става пробата за калибрирање и се **“set ref”**.
Insert sample	Во специјалниот слот се става примерокот и се одбира **“DNA”** или **“RNA”** според потребата.

2.3. Мерење на примерок

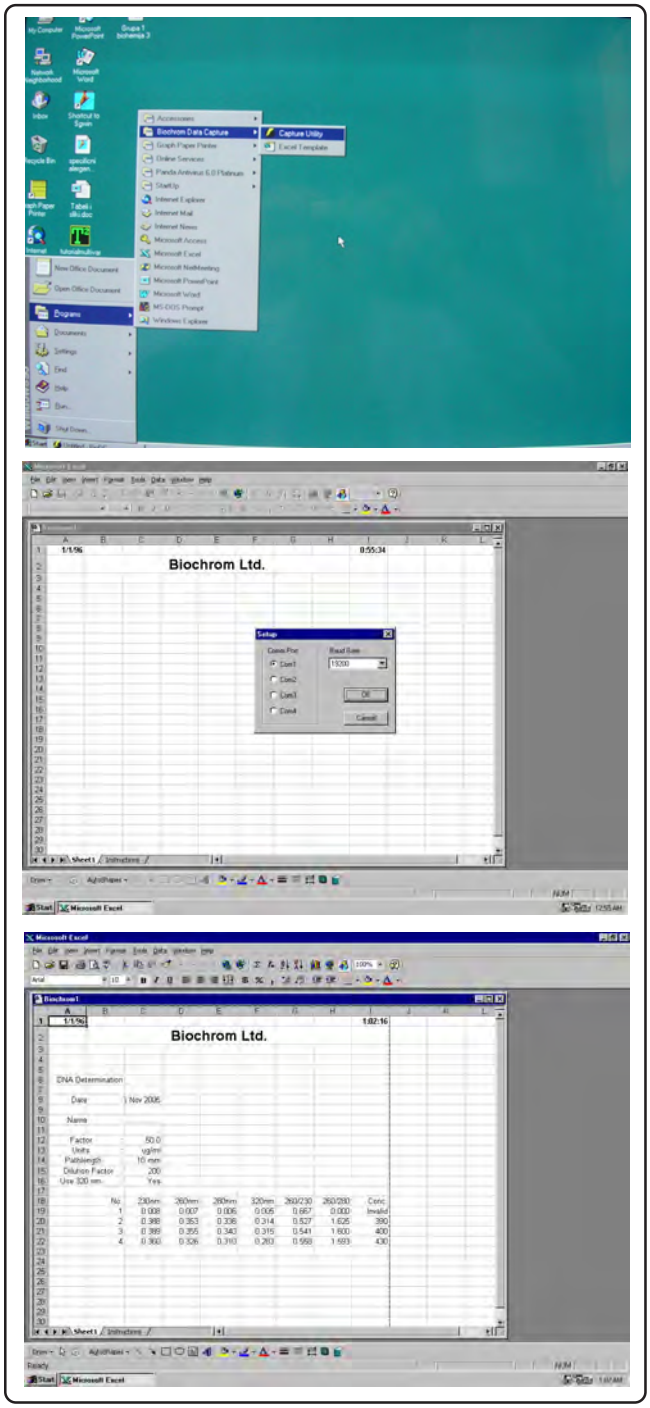
Додека апаратот е вклучен, се стартува компјутерот на кој претходно е инсталиран софтвер за мерење и складирање на податоците за измерени концентрации добиени од GeneQuant pro (Слика 2.3).

Софверот се активира на следниот начин: се избира Start > Programs > Biochrom Data Capture > Excel Data Template. Вообичаено, апаратот преку сериски кабел се поврзува со компјутерот преку портата Com 1, па во прозорецот кој се појавува се одбира Com 1. Доколку за поврзувањето се користи друга порта, тоа треба да се назначи со одбирање на соодветната опција (Com 2, 3 или 4).

По ова апратот е спремен за мерење (на што укажува трепкачка ознака Ready во левиот долен агол од прозорецот на Excel), а измерените вредности може да се превземаат и складираат во компјутерот.

Се притиска **“reading”** за да се одбере саканиот метод, а потоа **“set ref”** за да се калибрира инструментот со слепа проба (содржи само растворувач). Мерењата се прават за сите релевантни бранови должини и се прикажуваат како 0.000 вредности.

Се притиска **“reading”** или **“enter”** за секое ново отчитување



Слика 2.3: Приготвување на компјутерскиот програм Biochrom за мерење концентрациите на ДНК, РНК и/или ампликоните со GeneQuant pro RNA/ DNA Calculator од фирмата AmershamPharmaciaBiotech.

2.4. Определување концентрација на растворена ДНК со GeneQuant pro

1. Две чисти тубички се обележуваат едната со С (за слепа), а другата со Д (за ДНК)

2. Се додаваат 1 мЛ вода во С тубичката и 0.995 мЛ вода во Д тубичката.

3. Во Д тубичката се додаваат 5 мкЛ од ДНК растворот. Се промешува со нежно пипетирање.

4. Содржината од тубичката С се префрла во специјална кивета и се мери апсорбанцата на спектрофото-метарот (кој е подесен на 260 нм). Бидејќи во смешата нема ДНК, прочитаната апсорбанца би требало да биде блиску до 0. Доколку ова не е случај, спектро-фотометарот би требало да се калибрира на 0.

5. Киветата се испразнува и се промива со 0.1M NaOH и неколку пати со вода. Откако ќе се исуши, во неа се става содржината од тубичката Д и се мери концентрацијата.

6. Факторот за разредување кој треба да биде земен во предвид при пресметувањето на концентрацијата, е 200 (5 мкЛ растворени во вкупно 1000 мкЛ).

2.5. Задача

Задача за студентот: да се измери концентрација на непознат ДНК, РНК и олигонуклеотиден примерок и да се внесе во табелите 2.1 до 2.3.

Табела 2.1: Мерење концентрација на ДНК.

Одредување концентрација на ДНК							
Дата							
Студент	.....						
Фактор	50,0						
Мерна единица	мкг/мЛ						
Должина	10 мм						
Разредување							
Бранова должина	230нм	260нм	280нм	320нм	260/230	260/280	Концентрација
Измерена А1							
Измерена А2							

Табела 2.2: Мерење концентрација на РНК.

Одредување концентрација на РНК							
Дата							
Студент	.....						
Фактор	40,0						
Мерна единица	мкг/мЛ						
Должина	10 мм						
Разредување							
Бранова должина	230нм	260нм	280нм	320нм	260/230	260/280	Концентрација
Измерена А1							
Измерена А2							

Табела 2.3: Мерење концентрација на олиѓонуклеоѿиди.

Одредување концентрација на олигонуклеотиди							
Дата							
Студент	.....						
Фактор	33,0						
Мерна единица	мкг/мЛ						
Должина	10 мм						
Разредување							
Бранова должина	230нм	260нм	280нм	320нм	260/230	260/280	Концентрација
Измерена А1							
Измерена А2							

Дата Студент Асистент

_____ _____ _____

ВЕЖБА 3. ПОЛИМЕРАЗНО ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА (ПВР)

3.1. Вовед

Полимераза верижната реакција (ПВР) е метод чие што откритие има најголемо влијание во започнувањето на нова ера во молекулската биологија. За ова епохално откритие, неговиот инвентор Кери Мулис *(Kary Mullis)* стана добитник на Нобеловата награда за хемија во 1993 година. Процесот на ПВР е толку едноставен, пред се за молекуларните биолози, што се потврдува со познатата изрека на Кери Мулис *"Зошто до сега не помислив на ова?"*

Со нејзиното откритие, ПВР технологијата стана основна истражувачка и дијагностичка алатка за подобрување на здравјето на човекот и квалитетот на живеење. Со ПВР технологија научниците можат да земат примерок од генетски материјал, дури од една единствена клетка, да ја копираат генетската секвенца и да создадат примерок доволен да го открие присуството или отсуството на вирус, бактерија или било која секвенца од генетски материјал.

ПВР е основна алатка во *Хуманиот геномски проект,* бидејќи со неа може брзо и едноставно да се создадат неограничени количини на било кој дел од ДНК неопходни за оваа студија. *Хуманиот геномски проект* претставува огромен меѓународен проект каде што една од главните цели за комплетна идентификација на нуклеотидните секвенци на хуманиот геном, благодарение на ПВР технологијата, беше завршена порано од предвиденото време.

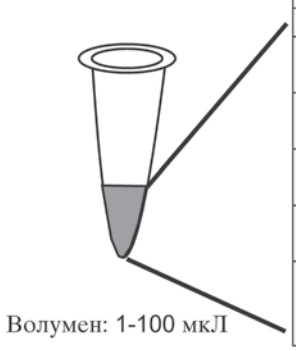
Според дефиниција, ПВР реакцијата е брза техника за *ин витро* амплификација на специфични ДНК фрагменти со користење на два кратки едноверижни започнувачи (прајмери) кои ги ограничуваат тие фрагменти. Со повторувани циклуси од денатурација со топлина на двоверижната матрична ДНК, прилепување на прајмерите и екстензија на прајмерите со употреба на термостабилна полимераза, фрагментот од интерес се амплифицира експоненцијално во милиони копии, означени како ***ампликони.*** Со ПВР реакција од мали количини ДНК, како оние што ги има во единечна клетка, може да се продуцираат микрограмски количини на ПВР продукт. ПВР продуктот може понатаму да се модифицира на многу начини со клонирање во вектор, одбележување за користење како проба или директно сенквенционирање.

3.2. Компоненти на стандардниот ПВР протокол

Компонентите на стандардниот ПВР протокол се следните (Слика 3.1):

1. Матрична ДНК - како двоверижна ДНК молекула. Матрицата може да биде со било каква големина, а во себе содржи секвенци со добро дефинирана должина каде што е и регионот од интерес кој треба да се амплифицира.

2. Пар на ПВР започнувачи (прајмери) - се состои од два едноверижни олигонуклетоди со должина од 18 - 20 нуклеотиди, кои се комплементарни со 5'-крајот од спротивната нишка на матричната ДНК. Со други зборови, секвенцата на едниот започнувач е идентична со едната матрична верига на едниот крај од регионот



СОСТОЈКА	ЗНАЧЕЊЕ
1-100 нг геномска ДНК	Матрица за синтеза
1 мкМ започнувачи	Неопходни за започнување на синтеза на специфична ДНК
4 нуклеотидни трифосфати (по 0,2 мМ од секој)	Градбени елементи за синтеза на ДНК
Так ДНК полимераза	Термостабилен ензим за синтеза на ДНК
Магнезиумови јони 1,5 - 5 мМ	Потребни за активност на ензимот
Пуфер: - pH=7,5 - 9,0 - сол (KCl или $(NH4)_2SO_4$	Неопходен за стабилна ензимска активност

Слика 3.1: Составни делови од една типична ПВР.

од интерес, додека секвенцата на другиот започнувач е идентична со спротивната верига од спротивниот крај на регионот од интерес.

На тој начин при денатурација со топлина на двете матрични нишки, двата започнувачи можат да хибридизираат со нивните комплементарни нишки на двата краја на регионот од интерес. При тоа, важно е да се одбере матрична нишка од која ќе се добие секвенцата на започнувачот, така што 3'-крајот на започнувачите ќе биде насочен кон регионот од интерес. Започнувачот кој се прилепува на "горната" (+) ДНК нишка се означува како преден ***(sense)***, а другиот кој ја копира "долната" (-) ДНК нишка како реверзен ***(antisense)*** прајмер.

3. Главното ограничување на ПВР, како широко применуван метод за експериментални цели, е потребата од претходно **познавање на секвенцата** на најоддалечените краеви на регионот од интерес кој е неопходно за синтеза на ПВР започнувачите. Сепак, постојат низа начини за надминување на овој недостаток.

4. Так полимераза е термостабилна ДНК полимераза, ензим изолиран од бактеријата *Thermus aquaticus*. Таа го препознава хибридот започнувач-матрица како субстрат, се врзува за хибридот, ја чита секвенцата од матрицата и ги користи комплементарните деоксинуклеотидни трифосфати присутни во ПВР смешата за да го екстендира започнувачот со формирање на нови фосфодиестерски врски, а на тој начин синтетизира комплементарна ДНК нишка.

5. Пуфер за реакција за Так полимераза содржи Трис, KCl, $MgCl_2$ и желатин. Концентрацијата на магнезиумот влијае врз специфичноста на продуктот, процесивноста на полимаразата и точноста, како и специфичноста на прилепувањето на започнувачите. Оптималната концентрација на магнезиумот варира за различни матрици и парови на започнувачи. Таа може да варира од 0.5 до 10 мМ, стандардно околу 1.5 мМ.

6. Смеша од сите четири деоксинуклеотидни трифосфати означена како **"(dNTP)"**- (dATP, dGTP, dCTP и dTTP) која е потребна за синтеза на комплементарната ДНК нишка.

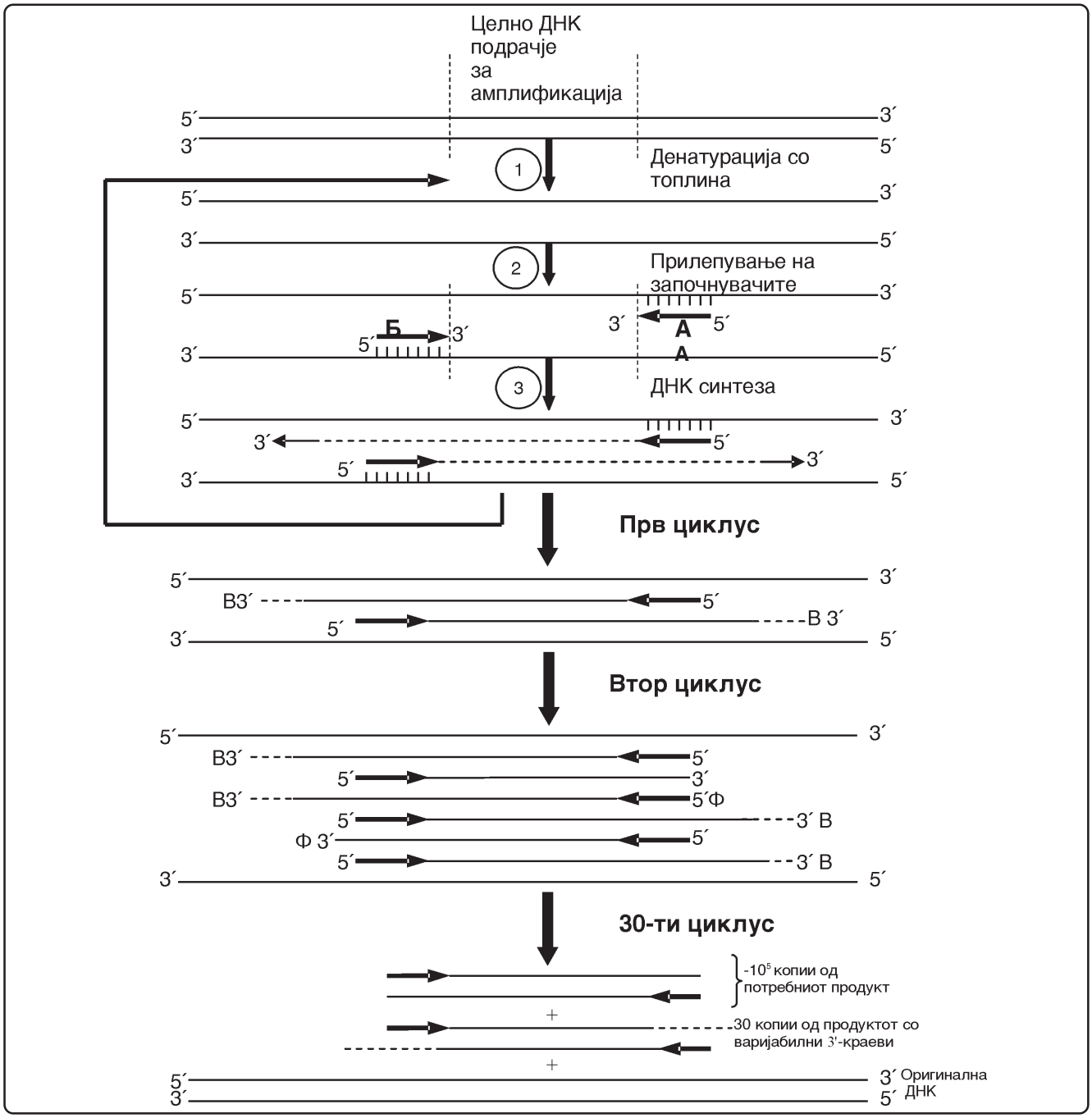
3.3. Механизам на ПВР

Во секој ПВР циклус, ПВР смешата се инкубира последователно на три различни температури кои овозможуваат денатурација на матрицата, прилепување на започнувачите и издолжување на започнувачите. Овие чекори се повторуваат во 30-40 циклуси, а реакцијата се изведува во автоматизирани термосајклери кои овозможуваат брзи промени на температурата за многу кратко време (Слика 3.2).

Трите чекори на ПВР циклусот се:

1. Денатурација на двоверижните ДНК молекули на **95°Ц**: За време на денатурацијата со топлина, се раскинуваат водородните врски помеѓу комплементарните бази и се одделуваат двете нишки од двоверижната ДНК, при што се добиваат едноверижни нишки.

2. Прилепување (хибридизација) на започнувачите со комплементарните секвенци од матричните ДНК нишки: Започнувачите се движат низ реакциската смеша според Брауновото движење. Постојано доаѓа до формирање и раскинување на јонски врски помеѓу едноверижните започнувачи и едноверижната матрица. Постабилните врски траат подолго време (започнувачите кои точно



Слика 3.2: ПВР реакција е ин витро метод за амплификација на ДНК секвенци со употреба на дефинирани олигонуклеотидни прајмери.

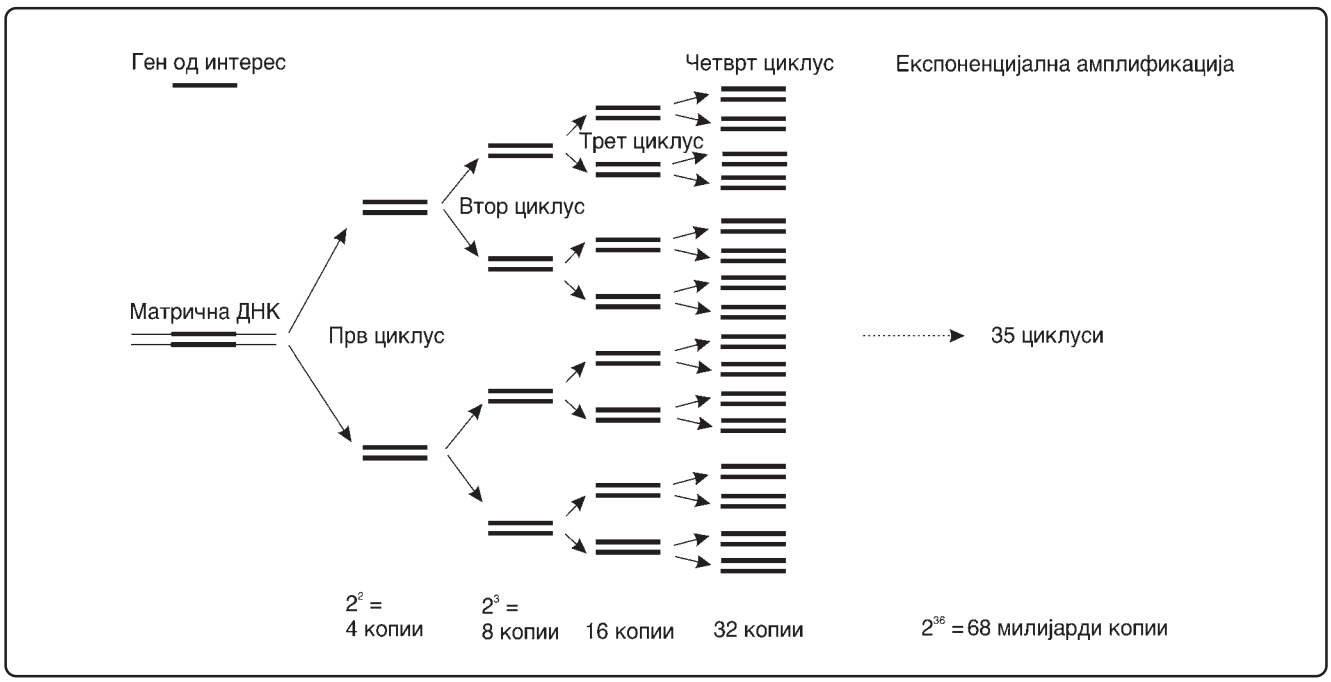
одговараат) и на тоа мало место од двоверижна ДНК (матрица и започнувач) се прикачува полимеразата и започнува копирање на матрицата. Кога ќе се формираат неколку бази, јонската врска меѓу матрицата и започнувачот станува толку силна, што повеќе не се раскинува.

3. Издолжување (полимеризација) на 3'-крајот на **72°Ц**: Во тек на издолжување на започнувачите, полимеразата на својата оптимална температура од 72°Ц ја екстендира секвенцата на прајмерите преку синтеза на нова ДНК нишка која е комплементарна на секоја матрична молекула, а на тој начин се дуплира бројот на копии на целниот регион. Започнувачите, каде што се формирани неколку бази, веќе имат посилни јонски врски за матрицата отколку силите кои доведуваат до нивно раскинување. Започнувачите кои се наоѓаат на место кое не е сосема точно, повторно заради високата температура, се раскинуваат и не доведуваат до издолжување на фрагментот. Нуклеотидите се додаваат во продолжение на започнувачот во насока 5'→3'. Базите, комплементарни на матрицата се сврзуваат на 3'-крајот (полимеразата ги додава dNTP од 5'→3', читајќи ја матрицата од 3'→5' страната, а базите се додаваат комплементарно на матрицата).

Олигонуклеотидните започнувачи Аи Б се комплементарни на ДНК секвенците кои се наоѓаат на спротивните ДНК нишки и го ограничуваат регионот што треба да се амплифицира. Прилепените започнувачи се инкорпорираат во ново синтетизираните ДНК нишки. Во првиот циклус се синтетизираат две нови ДНК нишки чии што 5'-краеви се фиксирани со позицијата на олигонуклеотидниот започнувач, но 3'-краевите се варијабилни. Двете новосинтетизирани нишки служат како матрица за синтеза на комплементарни нишки со посакуваната должина (5'-краевите се дефинираат со започнувачот, а 3'-краевите се фиксирани бидејќи синтезата не може да продолжи после крајот на спротивниот започнувач). По неколку циклуси, почнува да предоминира продукт со посакуваната големина (Слика 3.2).

ПВР циклусот понатаму се повторува во 30-40 циклуси и доведува до експоненцијална акумулација на ПВР продуктот (Слика 3.3). Големината на ПВР продуктот е дефинирана со растојанието помеѓу 5'- крајот на двете места на кои се прилепува прајмерот. На тој начин, ПВР продуктот може да се визуелизира како посебна лента *(band)* на агарозна гел електрофореза.

Специфичност: Специфичноста (или стрингентноста) на ПВР реакцијата примарно е опредеелна од секвенцата на започнувачите, температурата на



Слика 3.3: Експоненцијална амплификација на ген со ПВР.

прилепување на зпочну-вачите и концентрацијата на Mg^{2+} во пуферот на реакцијата. *Започнувачите* треба да се со големина од 18-30 бази. За да се обезбеди максимална специфичност, процентот на Г+Ц на започнувачите треба да биде приближно 50%. Секвенците на започнувачите не треба да бидат комплементарни помеѓу себе, ниту пак со другиот започнувач, посебно на 3'- крајот.

Температурата на прилепување треба да кореспондира со Тм (melting temperature) на започнувачите. Тм на започнувачите зависи од секвенцата на прајмерите и наједноставно се пресметува со формулата Тм = 2 x (А+Т) + 4 x (Ц+Г). Оптималната температура на прилепување ќе биде 5°Ц под Тм и е околу 55°Ц -72°Ц. Оптималната концентрација на $MgCl_2$ во реакцијата треба да се одреди емпириски за секој сет на започнувачи. Премногу $MgCl_2$ може да ја намали ефикасноста на амплификацијата, додека премалку $MgCl_2$ може да даде неспецифични продукти.

Прилепувањето на започнувачите трае неколку секунди. Висока стрингентност (високи температури на прилепување) се особено важни во тек на првите ПВР циклуси за да се подобри специфичноста.

Не постои единствен ПВР протокол кој би бил соодветен за сите експериментални истражувања. Заради тоа, ќе го опишеме стандардниот ПВР протокол кој може да се оптимизира за специфични апликации.

3.4. Потребно за изведување

3.4.1. Реагенси

- Матрична ДНК.
- Пар на олигонуклеотидни започнувачи.
- *Так* полимераза (на пр. Perkin Elmer Cetus).
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- 10 x пуфер за реакција за Так полимеразата (на пр. Perkin Elmer Cetus: 1x пуфер е Трис-HCl 50 мМ (pH 8.3), $MgCl_2$ 1.5мМ, KCl 25мМ, Tween 20 0.05%, автоклавиран желатин или говедски серум албумин без нуклеаза 100 мкг/мЛ).

3.4.2. Раствори

- Ампуларна вода.
- Силиконско масло.

3.4.3. Потрошен материјал

- 500 мкЛ Епендорф тубички или термоотпорна микротитарска плочка, која одговара на термосајклерот.
- Пластични продолжетоци (Микротипсови).

3.4.4. Опрема

- Автоматизиран термосајклер.
- Апарат за гел електрофореза за анализа на ПВР продуктот.

3.5. Изведување

3.5.1. Претходна подготовка во мраз

а. dNTP (Perkin Elmer Cetus): подготовка на раствор (1мМ од секој dNTP).

dATP (10 mM)	75 мкЛ
dCTP (10 mM)	75 мкЛ
dGTP (10 mM)	75 мкЛ
dTTP (10 mM)	75мкЛ
Ампуларна вода	450 мкЛ
Вкупен волумен	**750 мкЛ**

б. започнувачи: раствори до 20 мкМ (=20 пмол/мкЛ)

в. ДНК матрица: раствори до 10^5 - 10^6 матрични молекули/5 мкЛ ($3x10^5$ матрични молекули се еквивалент на 1мкг хумана геномска ДНК)

3.5. 2. Стандарден ПВР протокол

Овој протокол се однесува за 100 мкЛ реакција, но може да се прилагоди и за други волумени. За сите ПВР реакции кои се изведуваат со ист пар на започнувачи, се подготвува ***мастер микс*** кој ги содржи сите компоненти на ПВР реакција, освен ДНК молекулата. За н (н=број) реакции треба да се приготви мастер микс со волумен од н+1 реакции.

Во Епендорф од 1.5 мЛ треба да се приготви мастер микс со следните компоненти (Табела 3.1):

1. Аликвотирај еден волумен за реакција од мастер миксот во секоја ПВР тубичка.

Табела 3.1. Подготвување мастер микс (главна смеша) за изведување ПВР.

Компоненти	Волумен за една реакција	Конечна концентрација	Оригинална концентрација	Количина
1. ПВР пуфер	10 мкЛ	1 x	10 x	
2. dNTP	5 мкЛ	50 мкМ од секој dNTP	1 мМ од секој dNTP	5 нМ од секој dNTP
3. Пар започнувачи	2 x 1 мкЛ	0.2 мкМ од секој	20 мМ од секој	20 пМ од секој
4. Так полимераза	0.5 мкЛ	0.025 Е/мкЛ	5 Е/мкЛ	2.5 Е
5. Ампуларна вода	77.5 мкЛ*			
*Со додавање на 5 мкЛ од матричната ДНК, вкупниот волумен ќе изнесува 100 мкЛ за секоја реакција.				

2. Додади 5 мкЛ од матричната ДНК во секој ПВР примерок (10^5 - 10^6 матрични молекули) и промешај.

3. Покриј го со 50 мкЛ минерално масло.

Забелешка: За мултиплекс ПВР реакција (коамплификација со употреба на мултипни парови од прајмери) дотерај го волуменот со намалување на количината на водата.

4. По почетната денатурација на 95°Ц за 5 мин додади 30-40 ПВР циклуси во автоматизиран термосајклер со следните температури.

	Температура	Време
Иницијална денатурација	95 °Ц	5 мин
30-40 циклуси:		
Денатурација	95 °Ц	30 сек
Прилепување	55 °Ц	30 сек
Екстензија	72 °Ц	1.5 мин
Крајна екстензија	72 °Ц	5 мин

5. По последниот циклус, се прави крајната екстензија на 72 °Ц од 5 минути.

6. Анализирај ги примероците со агарозна или полиакриламидна гел електрофореза, користејќи 1/5 до ½ од волуменот.

За анализа на ПВР продуктот се користи 2% или 3% агарозен гел, приготвен од 2 гр (3 гр) агароза и 100 мл ТБЕ пуфер. За постигнување на добра резолуција во гелот се додава 5-10 мкЛ етидиум бромид со концентрација од 10 мг/мЛ, кој специфично се врзува за ДНК продуктот и флуоресцира под УВ светлина.

Гелот се подготвува во специјални кадички на кои се стават посебни чешли и се остава да полимеризира. Во бунарчињата од гелот се додава по 5 мкЛ од ПВР продуктот заедно со 2.5 мкЛ "loading" пуфер.

Во секоја ПВР реакција задолжително се користи негативна и позитивна контрола. *Негативната контрола* (слепата проба) ги содржи сите состојки од мастер миксот, со исклучок на матричната ДНК молекула. При анализа на агарозниот гел, на местото на аплицираната негативна контрола не смее да постои лента, која во спротивно би значела контаминација на продуктот со туѓи ДНК молекули. *Позитивната контрола* содржи позната ДНК секвенца од интерес и обично се наоѓа во комерцијално достапниот кит.

Забелешка: За да се земе од ПВР примерокот под слојот на минералното масло, продолжетокот треба да се потопи под слојот на маслото, да се отстрани малку воздух, да се допре дното на тубичката и да се повлече продолжетокот за половина милиметар. Во спротивно, минералното масло ќе се развлече по ѕидовите на тубичката. Мали траги од минерално масло не влијаат врз електрофорезата. Оваа процедура се избегнува кај новите термосајклери со горно греење, каде што нема потреба од нанесување минерално масло.

3.6. Проверка на ПВР продуктот

Пред да се користи ПВР продуктот за натамошни анализи, треба да се провери:

1. Дали е формиран ПВР продукт? ПВР реакцијата не е секогаш успешна. Тоа може да биде резултат од лошиот квалитет на ДНК, несоодветни започнувачи или заради голема количина на почетен матричен материјал. Доколку нема ПВР продукт, треба да се превземат следните мерки:

– Да се пушти позитивна контрола со ПВР продукт кој е сличен по големина на очекуваниот продукт;

– Да се промени количината на матричниот материјал. Понекогаш производот може да биде мал, заради голема количина од ДНК (матрицата).

2. Дали ПВР продуктот е со точна големина? Постои можност да се види продукт, на пример лента од 500 бази, а очекуваниот ген треба да биде со големина од 1800 бази. Во овој случај, еден од започнувачите веројатно одговара на дел од генот во близина на другиот започнувач. Исто така, постои можност дека двата започнувачи одговараат на сосема друг ген. Доколку се добие погрешен ПВР продукт, треба да се преземат следните мерки:

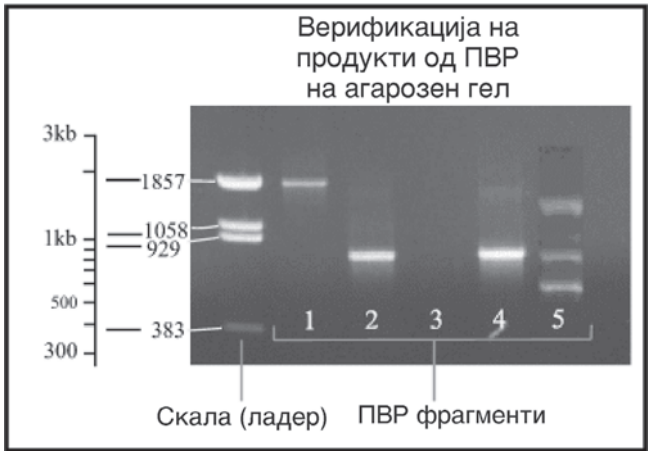
– Да се одреди оптималното време за издолжување со користење на контролен пар на започнувачи за да се добие продукт со слична големина;

– Да се користат други температури за прилепување на започнувачите, почнувајќи од 50°Ц, со зголемување на температурата за 5 °Ц во секој следен експеримент.

3. Формирана е само една лента. Како што е претходно опишано, можно е започнувачите да одговараат на бараните локации, но исто така и на други локации. Во тој случај, ќе имаме различни ленти во една линија на гелот.

4. Скала (*Ладер)* е смеша од фрагменти со позната големина со цел да се споредуваат со добиените ПВР фрагменти. Растојанието помеѓу различните фрагменти на ладерот е логаритамско (Слика 3.4).

5. Започнувачи (прајмер) димери. Кога се дизајнираат ПВР започнувачи, особено е важно да се избегне комплементарноста на 3'- крајот на двата започнувачи



Слика 3.4: Верификација на ПВР продуктот на агарозен гел.

Линија 1: ПВР фрагментот е со големина од околу 1850 базни пара; Линија 2 и 4: фрагментите се со големина од околу 800 базни пара; Линија 3: нема ПВР продукт, значи ПВР не бил успешен; Линија 5: формирани се повеќе бендови бидејќи еден од започнувачите одговара на различни места.

и само комплементарност на 3'- крајот на секој посебен започнувач одделно. Во спротивно, започнувачите можат да хибридизираат и да се појави артефакт од започнувачки димери или мултимери.

6. Погрешно вградување (инкорпорација). За да се одбегнат артефакти кои се резултат од огрешно вградување од *Так* полимеразата, автенетичната секвенца на целниот регион може да се најде со секвенционирање на неколку независни ПВР продукти и да се донесе консензус за секвенцата.

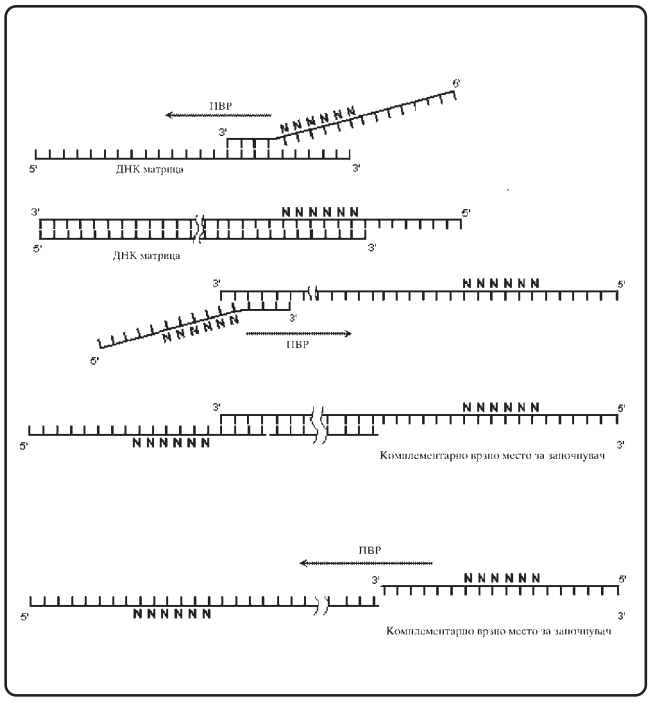
7. Одбегнување на контаминација на матричниот материјал. Треба да се користат пипети, наменети исклучително за ПВР реакција. ПВР реакцијата се изведува во просторија која е одделена од просторијата за анализа на продуктот. За реакциите со идентични започнувачи, се користи мастер микс кој ги содржи сите компоненти со исклучок на матричната ДНК. Секогаш се анализира и негативна контрола, која го содржи мастер миксот, а не ја содржи матричната ДНК. Да се користат различни пипети за подготвка на мастер миксот и за додавање на матричната ДНК. Да не се направи вкрстена контаминација на примероците кога се додава минералното масло.

3.7. Амплификација на целиот геном

Кога располагаме со мало количество геномска ДНК, можеме да направиме амплификација на целиот геном. За таа цел се користат две методи.

3.7.1. ПВР со дегенерирани олигонуклеотидни започнувачи

DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR) - ПВР иницирана со дегенерирани олигонуклеотиди е форма на ПВР која е дизајнирана да овозможи амплификација на повеќе продукти. Вообичаено, двата започнувачи се парцијално дегенерирани олигонуклеотиди, кои се состојат од панели на олигонуклеотидни секвенци кои имаат исти бази на одредени нуклеотидни позиции, но се разликуваат на други. Во овој метод, се користат куси започнувачи со случајно одбрани секвенци (дегенерирани започнувачи) се врзуваат за многу различни места долж геномот и овозможуваат неспецифична амплификација на целокупниот геном



Слика 3.5: Шематски приказ на ПВР со дегенерирани олигонуклеотидни започнувачи (Degenerate oligonucleotide-primed PCR = DOP-PCR).

(Слика 3.5).

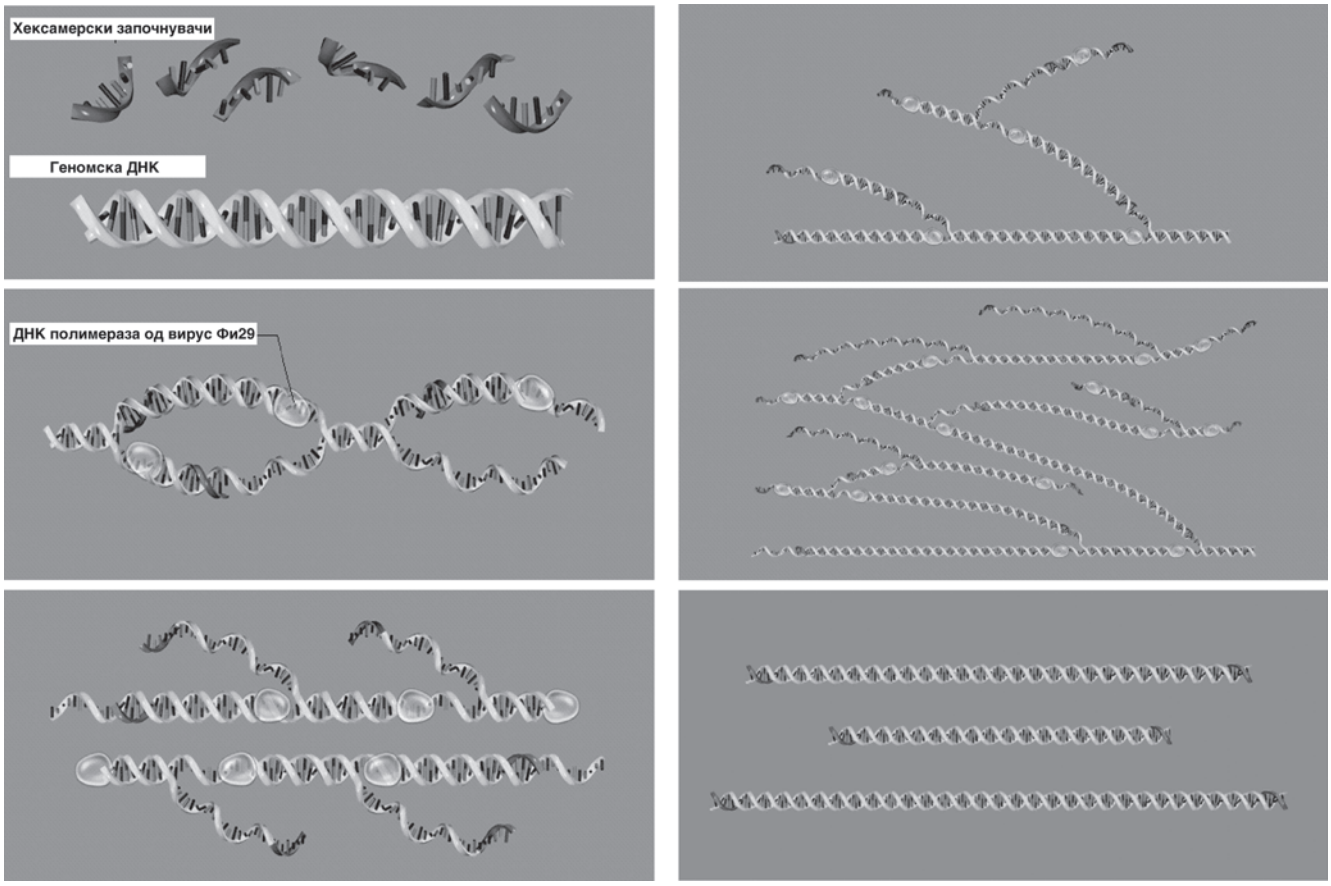
3.7.2. Амплификација со повеќекратно изместување (Multiple displacement amplification = MDA)

Оваа метода се изведува со дегенерирани започнувачи, но се користи полимераза од бактериското вирус Фи29 за да се синтетизираат долги молекули (над 10 кб) ДНК врз матрицата. Секоја новосинтетизирана верига се изместува на нејзиниот 5' крај со следната синтетизирана молекула, при што новите синтетизирани молекули и самите стануваат матрици за натамошна синтеза. Со овој метод можат да се синтетизираат 20 до 30 микрограми (мкг)репрезентативна, високо квалитетна, високо молекуларна ДНК од само неколку билионити делови од микрограмот на почетната ДНК. Методот е извонредно важен за сите испитувања во кои имаме исклучително мали почетни количества ДНК за анализирање (Слика 3.6).

3.8. Други форми на ПВР

• **Ин ситу ПВР** - Овој вид на ПВР, слично на ин ситу хибридизацијата, се базира на ДНК детекција на специфични секвенци во хистолошки пресеци или цитолошки размаски. Ин ситу ПВР се одвива на микроскопски стакленца на кои се наоѓаат култивирани клетки или ткивни пресеци. Пет микролитри од ПВР смешата се додаваат директно на клетките и ткивните пресеци, се покриваат со пластична покривка, и се стават во посебни термосајклери.

• **Вгнездена ПВР (Nested PCR)**. Овој вид на ПВР се користи за зголемување на сензитивноста и специфичноста на амплификацијата. Специфичноста на ПВР реакција е одредена од специфичноста на прајмерите. На пример, ако прајмерите се врзуваат за повеќе од еден локус, тогаш ќе се амплифицира повеќе од еден сегмент на ДНК. За да се контролираат овие негативности, се користат вгнездени започнувачи кои обезбедуваат специфичност. Во nested ПВР се користат два пара на ПВР започнувачи за единечен локус. Првиот пар започнувачи го амплифицира локусот. Вториот пар започнувачи (вгнездени започнувачи) се врзуваат за првиот ПВР продукт и продуцираат втор ПВР продукт кој ќе биде пократок, но со многу повисок принос и специфичност. Логичниот приод во оваа стратегија се заснова на тоа дека, доколку по грешка е амплифициран погрешен локус, постои мала веројатност дека тој ќе се амплифицира повторно со



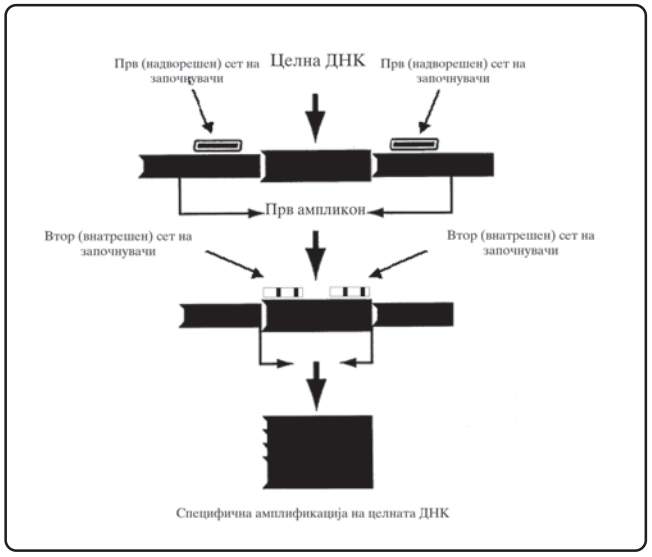
Слика 3.6: Шематски приказ на Амплификација со повеќекратно изместување (Multiple displacement amplification = MDA).

вториот пар на прајмери (Слика 3.7).

- **Риал тајм ПВР** - (исто така познат и како *Quantitative PCR, Real-time Quantitative PCR,* или *RTQ-PCR но,* ***не*** *RT-PCR*) е метод на истовремена ДНК квантификација и амплификација. ДНК специфично се амплифицира со ПВР. По секој циклус на амплификација, ДНК се квантифицира. Вообичаените методи за квантификација вклучуваат употреба на флуоресцентни бои кои се вметнуваат во двоверижната ДНК и модифицирани ДНК олигонуклеотиди (наречени проби) кои флуоресцираат кога хибридизираат со комплементарна ДНК. Многу често риал тајм ПВР се комбинира со РТ-ПВР за да се квантифицираат мали количини на мРНК, што им овозможува на научниците да ја квантифицираат релативната генска експресија во одредено време, или на одредена клетка или ткиво. Комбинираната техника често се нарекува квантитативен РТ-ПВР

- **РТ-ПВР** -кратенка од **R**everse **T**ranscription-**P**olymerase **C**hain **R**eaction. РТ-ПВР е техника во која РНК нишката реверзно се транскрибира во нејзината комплементарна ДНК, следено со амплификација на таа ДНК со ПВР. Транскрипцијата на РНК нишката во нејзината комплементарна ДНК се означува како реверзна транскрипција и се постигнува со употреба на РНК зависна ДНК полимераза (реверзна транскриптаза). Потоа, втората ДНК нишка се синтетизира со употреба на деоксиолигонуклеотиден започнувач и ДНК зависна ДНК полимераза. Комплементарната ДНК и нејзината *antisense* нишка потоа експоненцијално се амплифицираат со ПВР. Оригиналната РНК матрица се деградира со *RNaza* Н и останува само кДНК.

Експоненцијалната амплификација со РТ-ПВР е сензитивна техника, каде многу мал број на РНК копии може да се детектираат со РТ-ПВР. Таа се користи во дијагностика на генетски заболувања, а квантитативно

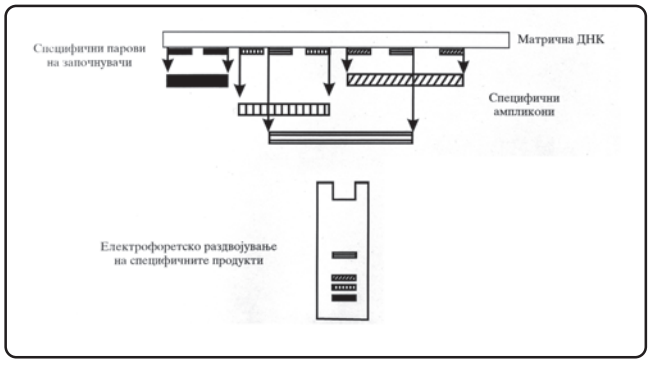


Слика 3.7: Шематски приказ на вгнездена ПВР.

во одредување на количината на специфичната РНК, како мерка за генската експресија.

РТ-ПВР понекогаш се однесува на риал-тајм ПВР, кое е всушност продолжување на оригиналната ПВР процедура и дизајнирана за квантификациски цели. Риал тајм се однесува на фактот дека квантитативните ПВР машини го следат и прикажуваат прогресот на ПВР реакцијата како што таа тече. За да се избегне забуна меѓу двете техники означени како РТ, терминот *quantitative PCR, quantitative RT-PCR* или *RTQ-PCR* (`Real-Time Quantitative PCR') се употребува за риал-тајм, квантитативни анализи.

- **Мултипелкс ПВР** - Мултиплекс ПВР реакција е варијанта на ПВР со која се овозможува истовремена амплификација на повеќе целни региони во една реакција со употреба на повеќе пара на прајмери. Од нејзиното откривање во 1988 година од *Chamberlain* и соработниците, овој метод се применува во многу подрачја на ДНК тестирањето, вклучувајќи анализи на делеции, мутации, полиморфизми или квантитативни анализи и РТ-ПВР (Слика 3.8).



Слика 3.8: Шематски приказ на мултиплекс ПВР.

- **Тачдаун ПВР (Touchdown PCR)** е метод на ПВР каде се користат дегенерирани започнувачи за да се избегне амплификација на неспецифични секвенци. Првите чекори кај оваа ПВР имаат високи температури на прилепување (температури кога најмалку е можно неспецифично врзување). Во секој следен циклус, температурата на прилепување се намалува за 1°Ц. Започнувачите ќе се прилепат на највисоките температури на кои е можно. Значи првите амплифицирани секвенци се оние помеѓу регионот од најголема специфичност за започнувачите, што е најверојатно дека е секвенцата од интерес. Овие фрагменти понатаму се амплифицират во следните циклуси на пониски температури и се зголемува ефикасноста на амплификацијата, но се избегнува амплификацијата на неспецифичните секвенци за кои може да се врзат започнувачите доколку се започне со ниски температури.

3.9. Задачи

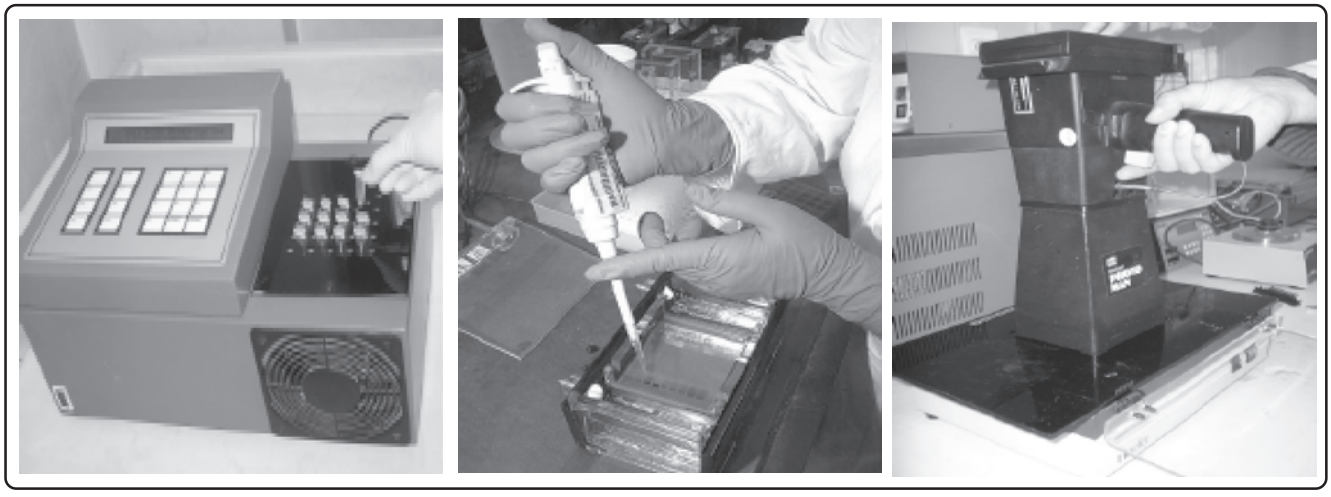
3.9.1. Да се изведе ПВР амплификација на егзоните 2 и 3 од гените на ХЛА-класа 1 за локусите ХЛА -А, -Б и -Ц со биотинилирани започнувачи

Протокол за ПВР амплификација на егзоните 2 и 3 од ХЛА-А, Б и Ц гените:

За ХЛА-А, -Б и Ц локус:

1. Мастер микс за ХЛА-А, Б и Ц локус	30 мкЛ
2. $MgCl_2$	15 мкЛ
3. H_2O	10 мкЛ
4. ДНК	5 мкЛ
Вкупен волумен	**60 мкЛ**

Термален циклус на амплификација (Слика 3.9):



Слика 3.9: Внесување примероци за ПМВ во циклер (лево), пипетирање на амликоноt во кадичка за гел електрофореза (средина) и фотографирање на гелоt со Полароид камера (десно).

	Температура	Време
Иницијална денатурација	95 °Ц	5 мин
30 циклуси:		
Денатурација	95 °Ц	15 сек
Прилепување	62 °Ц	45 сек
Екстензија	72 °Ц	15 сек
Крајна екстензија	72 °Ц	5 мин
До употреба	15 °Ц	бесконечно

3.9.2. Да се провери присуството и точноста на ПВР продуктот на агарозна гел електрофореза

Локус	Големина на фрагменти	
	Егзон 2	Егзон 3
ХЛА-А	480 бп	314 бп
ХЛА-Б	376 бп	355 бп
ХЛА-Ц	440 бп	618 бп

Место за слика од провереният ПВР продукт со агарозна гел електрофореза (Слика 3.10).

Запиши ја големината на добиените фрагменти (Табела 3.2).

Слика 3.10: Место за слика од провереният ПВР продукт со агарозна гел електрофореза.

Табела 3.2. Големина на добиените фрагменти од ПВР на двата егзони од класа 1 ГТСК.

Локус	Егзон 2	Егзон 3
ХЛА-А		
ХЛА-Б		
ХЛА-Ц		

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

БЛОК 2

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 4. ИЗОЛАЦИЈА НА РНК И РЕВЕРЗНА ТРАНСКРИПЦИЈА НА ПВР (РТ-ПВР)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- изолираат РНК од периферна крв;
- проверат интактност на РНК;
- направат реверзна транскрипција на ПВР (РТ-ПВР)

ВЕЖБА 5. ДОЛЖИНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ НА РЕСТРИКЦИСКИ ФРАГМЕНТИ (ДПРФ)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- како се изведува методот должински полиморфизам на рестрикциски фракгемни и зошто се користи;
- да испитаат мутација за C282Y за хемохроматоза со методот на ДПРФ.

ВЕЖБА 6. ССП (SEQUENCE-SPECIFIC PRIMING) МЕТОД

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- како се изведува и за што се употребува ССП методот;
- да изведат метод на ССП.

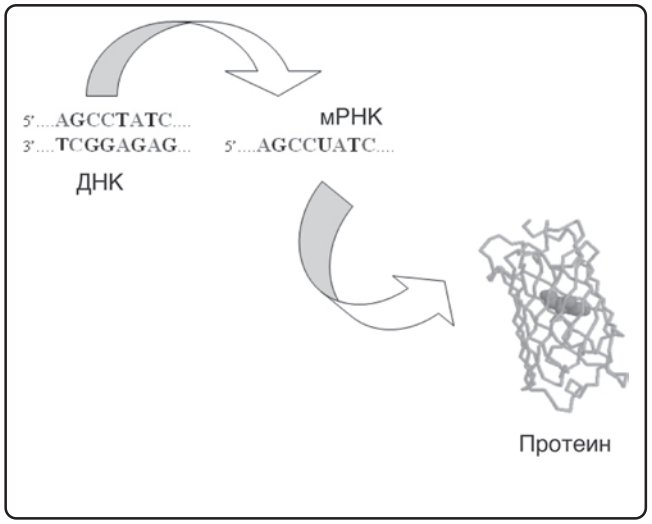
ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	0.50 поени
ЗНАЕЊЕ	2.50 поени
ВКУПНО:	3.00 поени

ВЕЖБА 4. ИЗОЛАЦИЈА НА РНК И РЕВЕРЗНА ТРАНСКРИПЦИЈА НА ПВР (РТ-ПВР)

4.1. Вовед

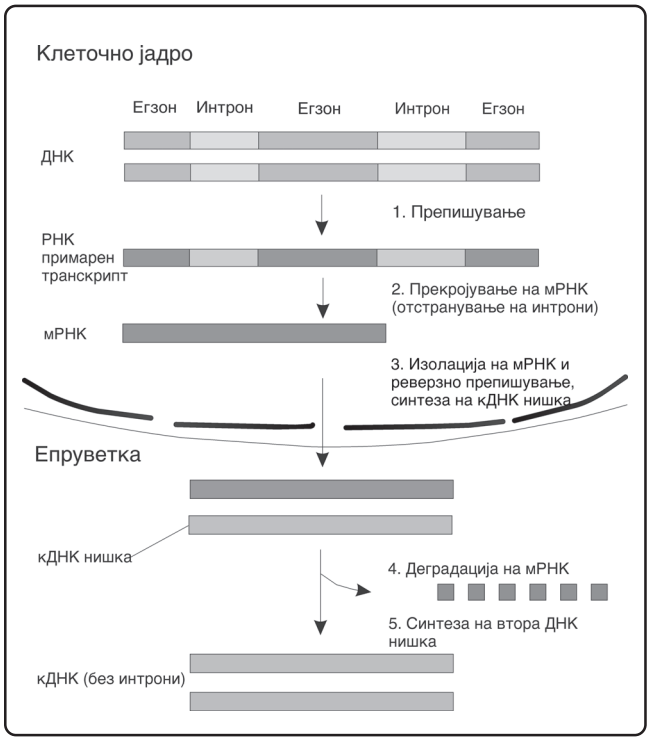
Централната догма во молекулсакта биологија гласи дека биолошките информации одат од ДНК преку РНК до протеини. Откако беа откриени вируси (вирусот на ХИВ на пример) кои имаат РНК геноми кои се препишуваат во ДНК со помош на ензим наречен реверзна транскриптаза, молекулските биолози почнаа да го користат овој ензим за преведување на гласничката РНК во комплементарна ДНК (кДНК). Оваа кДНК е многу позгодна за следни испитувања (на пример секвенционирање) бидејќи е далеку постабилна од РНК која лесно се деградира од насекаде присутните ензими РНази (Слика 4.1).



Слика 4.1: Централна догма: биолошката информација оди од ДНК кон РНК па до создавањето на протеин.

4.2. Изолација на РНК

Голем број од анализите во човечката молекулска генетика (дијагностика и истражување) користат РНК како почетен материјал. Генерално, информационата РНК е од најголем интерес знаејќи дека таа го содржи преписот од наследната инфомација запишана во ДНК и дека разните мутации кои се причина за наследните заболувања всушност претставуваат промени во наследната информација (Слика 4.2).



Слика 4.2: Етапи на реверзна транскрипција на РНК.

4.2.1. Изолација на РНК од лимфоцити/леукоцити од периферна крв или солидно ткиво со употреба на Тризол

Овој метод овозможува изолација на тотална РНК. Како почетен материјал може да се користат солидни ткива, клетки кои се одгледувани *ин витро* или леукоцити/лимфоцити од периферна крв. При изолација на РНК треба се внимава примерокот да не се контаминира со рибонуклеази кои релативно брзо ќе ја разградат РНК. За таа цел, во текот на процедурата треба да се носат ракавици, сите лабораториски садови треба да се стерилни (автоклавирани), а водата третирана со диетил поликарбонат (ДЕПК). Идеално, изолацијата на РНК се спроведува или во посебна просторија или алтернативно во дел од лабораторијата кој е наменет за таа цел. Пред и по инкбациониот период примерокот треба да се држи на мраз.

4.2.1.1. Изолација на РНК од леукоцити/ лимфоцити од периферна крв

Леукоцитите или лимфоцитите се издвојуваат од периферна крв со употреба на една од стандардните техники. Алтернативно, може да се користат лимфоцити или други клетки одгледувани *ин витро*. Почетниот број на клетки треба да биде 5-10 x10^6 (приближно бројот на лимфоцити во 1 мЛ периферна крв). Во тубичката која ги содржи клетките се додава 1 мЛ тризол и тубичката се превртува неколку пати рачно, и се остава на собна температура 5-10 мин. На крајот од инкубацијата се забележува дека содржината на тубичката е вискозна.

4.2.1.2. Изолација на РНК од солидни ткива

Во принцип може да се користи било кое ткиво. Во хуманата генетика, ткивата се добиваат или пост мортем, хируршки или со биопсија. За потребите на оваа вежба како почетен материјал се корсти орган добиен по жртвување на лабораториско животно. Потребни се 100 мг ткиво. Во тубичката се додава 1 мЛ тризол и содржината се хомогенизира со ткивен хомогенизатор. Алтернативно, ткивото може да се процесира преку сито. Во двата случаја, примерокот се остава на собна температура 5-10 мин. Пред и по инкбациониот период примерокот треба да се држи на мраз.

Забелешка: доколку има потреба, примерокот (клетки/ткиво со тризол) може да се замрзне на -70^{0}Ц во оваа фаза.

1. Центрифугирај го примерокот (14 000 ввм, 10 мин, 4^{0}Ц). По овој чекор РНК се наоѓа во супернатантот. Долната фаза ја содржи ДНК растворена во фенол. Оваа фаза може да се искористи за изолација на ДНК.
2. Префрли го супернатантот во нова тубичка и додади 200 мЛ хлороформ. Промешај ја тубичката енергично со рака 15 сек. Остави го примерокот на собна температура 3-5 мин.
3. Центрифугирај го примерокот (14 000 ввм, 10 мин, 4^{0}Ц). По овој чекор РНК се наоѓа во супернатантот.
4. Префрли го примерокот во нова тубичка, внимавајќи да не се наруши бариерата помеѓу двете течни фази. Додади 500 мЛ изопропанол и инкубирај го примерокот на собна температура 10 мин. Во оваа фаза РНК преципитира.
5. Центрифугирај го примерокот (14 000 ввм, 10 мин, 4^{0}Ц). По овој чекор РНК се гледа како бел талог на дното на тубичката.
6. Одстрани го супернатантот и додади 1 мЛ 75% етанол. Промешај ја тубичката и центрифугирај 14 000 ввм 14 000 ввм, 10 мин, 4^{0}Ц.
7. Отстрани го супернатантот и остави ја тубичката отворена 10-15 мин.
8. Додади 50 мЛ вода (третирана со ДЕПК) и инкубирај ја тубичката на 55-60^{0}Ц 10-15 мин.
9. Замрзни го примерокот на -70^{0}Ц.

4.3. Изолација на РНК со растворД

Примерок 3-5 мЛ крв се добива со внимателна венепункција со ЕДТА како антикоагуланс.

1. Примерокот 3-5 мЛ периферна крв се префрла во пластична епрувета од 15 мЛ и се дополнува со ретикулоцитен раствор до 14 мЛ. Клетките се мијат со растворот 10 минути со рачно мешање на тубата или на мешалка.
2. Епруветите се центрифугираат на 1800 (до 2500)

ввм, 10 минути на 4^{0}Ц, по што клетките се добиваат во талогот.

3. Со вакуум се аспирира супернатантот и на клетките во талогот им се додава раствор за лизирање на еритроцитите до вкупен волумен 14 мЛ. Талогот треба да е одлепен и убаво ресуспендиран.

4. Епруветите се мешаат рачно или на мешалка 10 минути, при што доаѓа до лизирање на еритроцитите. Лизирањето треба да продолжи додека супернатантот не се избистри (да добие лакирана боја, боја на вино).

5. Епруветите се центрифугираат на 1800 (до 2500) ввм, 10 минути на 4^{0}Ц, по што се добива видлив бел талог од леукоцити.

Забелешка: Еднојадрените клетки може да се добијат и на друг начин, на пример со користење на фикол.

6. Се работи во 1.5 мЛ епендорфи. На леукоцитите добиени од 3-5 мЛ крв им се додава 500 мкЛ раствор Д (4М гванидин тиоцијанат, 25мМ натриум цитрат pH 7.0, 0.5% саркозил, 0,1М 2-меркаптоетанол) и растворот се хомогенизира со енергично пипетирање. Суспензијата треба да отстои на собна температура најмалку 5 минути.

7. Се додаваат 55 мкЛ 2М натриум ацетат (pH=4), 500 мкЛ фенол (заситен со вода) и 110 мкЛ хлороформ-изоамил алкохол (во однос 49:1), смешата убаво се промешува со превртување 10 секунди, по што се инкубира на мраз 15 минути.

8. Смешата се центрифугира на 13000 ввм 30 минути на 4 Ц. По центрифугирањето, РНК е присутна во горната (водена) фаза, додека ДНК и протеините се наоѓаат во интерфазата, односно во фенолната фаза.

9. Горната (водената) фаза се префрла во нов епендорф и се додава ист волумен изопропанол (~600 мкЛ). Тубичката се инкубира на -20^{0}Ц, најмалку 90 минути или преку ноќ.

10. РНК се исталожува со центрифугирање на 13000 ввм 30 минути на 4^{0}Ц.

11. Талогот се плакне 2 пати со 70% етанол, по што РНК се суши на 65^{0}Ц и се раствора во 20 мкЛ стерилна вода. Ако не се користи веднаш, примерокот на РНК моте да се чува смрзнат на -20^{0}Ц со години.

4.4. ДЕПК третирана вода

Бидејќи РНК е многу сензитивна кон рибонуклеазите, секој од чекорите на изолација на РНК треба да вклучи употреба на стерилни и автоклавирани лабораториски садови. Водата која се користи за приготвување раствори и растворање на РНК треба да е третирана со диетил поликарбонат. Диетил поликарбонатот ги дериватизира хистидинските остатоци во протеинските секвенци и на тој начин ги инактивира нуклеазите, вкучително и рубонуклеазите. ДЕПК третираната вода може да се набави комерцијално или да се припреми во лабораторијата.

1. Раствори го ДЕПК 1:100 во апсолутен етанол.
2. Помешај 900 мЛ вода со 100 мЛ ДЕПК (од точка 1).
3. Отави го растворот на 37-42^{0}Ц преку ноќ.
4. Автоклавирај го растворот 45 мин.

4.5. Определување концентрацијата на РНК

Концентрацијата на РНК се определува спекрофотометриски. Протоколот е подетално опишан во вежбата за определување концентрацијата на ДНК, со таа разлика што во овој случај апсорбанцијата се отчитува на 260 нм а константата е 40.

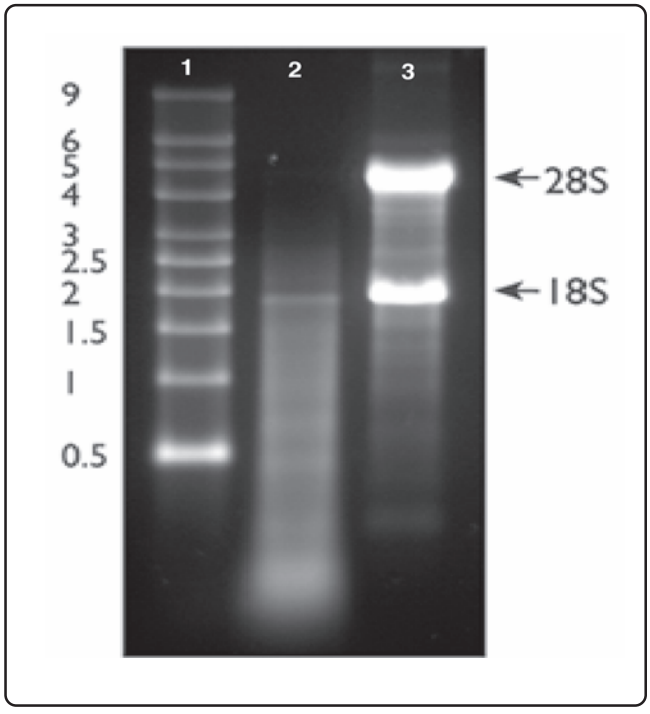
Пример: абсорбанција (260 нм) = 0.800

Концентрација = 0.800 x 40 = 32.0 нг/мЛ

Односот помеѓу абсорбациите прочитани на 260 и 280 нм треба да биде во рангот 1.6-2.0.

4.6. Електрофореза на РНК

За електрофореза на РНК помешај 5 мкЛ од примерокот со боја за електрофореза (идеално на гарозен гел обоен со етидиум бромид може да се види количина од 200-400 нг РНК). Агарозниот гел треба да е со концентрација 1%. По елекрофорезата се добива следниот резултат (Слика 4.3):



Слика 4.3: Гел електрофореза на РНК.

Линија 1, стандард за големина на фрагментите; Линија 2, деградиран примерок; Линија 3, раздвоени три популации РНК

1. 28С рРНК

2. 18С рРНК

Информационата РНК се гледа како развлечен облак помеѓу 0.5 кбп и 6 кбп.

Идеално фрагментот 28С рРНК (рибозомална РНК) треба да е со двојно поголем интензитет од фрагментот 18С рРНК. Преку овој однос може да се суди за интактноста на РНК во примерокот.

4.7. Реверзна транскрипција на полимеразно верижна реакција (РТ-ПВР)

Во една од претходните вежби се опишани принципите и протоколот за полимиразно верижна реакција (ПВР). Генерално, ПВР овозможува амплифицирање на определен сегмент ДНК содржан помеѓу двете куси нуклеотидни секвенци (прајмери или започнувачи) кои го ограничуваат регионот од ДНК кој се амплифицира.

РТ-ПВР се одвива во две фази. Во првата фаза (реверзна транскрипција или синтеза на првата верига) како почетен материјал користи РНК. Првата ДНК верига се добива со употреба на ензимот реверзна транскриптаза. Овој ензим користи куса олигонуклеотидна секвенца (започнувач) и, користејќи РНК како матрица, синтетизира ДНК верига на принципот на комплементарност. Веригата ДНК која се добива како резултат на реверзната транскрипција е комплементарна со нуклеотидната секвенца содржана во РНК.

По дефиниција, кДНК е двоверижна ДНК која потекнува од гласничка РНК. По изолирањето на гласничката РНК (или вкупната РНК), потребни се уште нуклеотиди, започнувачи (прајмери) и реверзна транскриптаза (која е ДНК полимераза) за да се создаде комплементарната ДНК (создавање на првата нишка) (Слика 4.4). Потоа се отстранува (деградира) информациската РНК и се синтетизира втората верига од комплементарната ДНК.

Во втората фаза од РТ-ПВР синтетизираната прва верига ДНК се користи како матрица за вообичаената ПВР реакција во текот на која бројот на копии ДНК се умножува експоненцијално во секој нов ПВР циклус. ДНК која се добива на овој начин е позната како кДНК или копирана ДНК.

Комбинацијата од изолација на РНК и РТ-ПВР овозможува неколку значајни анализи во молекуларната генетика. кДНК може да се користи за сите видови на анализа на секвенци (слично како ДНК). Суштинската разлика лежи во фактот што кДНА всушност е репрезент на секвенците од ДНК кои се



Слика 4.4: За создавање на комплементарна ДНК се потребни: информациска РНК како матрица, деоксинуклеотиди (dNTP), реверзна транскриптаза и започнувач (прајмер).

прикажуваат (експресираат - препишуваат во РНК) во одделни ткива. Така, анализата на кДНК овозможува увид во специфичноста на експресијата на поеднечни гени во поединечни ткива, или анализа на експресијата на поединечни гени, гени во едно и исто ткиво (или дури клеточна субпопулација) во различни развојни стадиуми.

РТ-ПВР реакција се користи и со цел да се квантифицира експресијата на поединечни гени. Принципот на овие квантитативни ПВР техники лежи во комбинирањето на ПВР реакцијата со флуоресцентна боја која се врзува во новосинтетизираната ДНК (или употреба на флуоресцентно обележана проба која се разградува во текот на ПВР реакцијата) и детектирање на интензитетот на флуоресцентниот сигнал во текот на реакцијата.

Во годините по завршувањето на хуманиот геном проект на сцената се појавија и техники кои овозможуваат глобален увид во експресијата на геномот во целост. За таа цел се користат нуклеотидни секвенци кои кореспондираат на секвенците на речиси сите гени содржани во геномот. Овие секвенци се имобилизирани на микроскопски стаклениња, таканаречени микрочипови. Во фазата во која се синтетизира првата верига, кДНК веригите може да се обележат со флуоресцента боја, и вака припремената кДНА се хибридизира на микрочипот. Со употреба на специјални системи за детекција на флуоресцентите сигнали и соодветен софтвер за анализа, можно е да се добие увид во степенот на експресија на огромен број гени во определени ткива или клеточни популации.

4.7.1. Синтеза на првата верига

За синтеза на првата верига се користи ензимот реверзна транскриптаза. Овој ензим синтетизира ДНК, а како матрица користи РНК. Ензимот може да ја започне реакцијата само со помош на куса нуклеотидна секвенца (прајмер или започнувач). Во зависност од тоа каков тип на прајмер се користи, синтезата на првата верига може да биде од три вида (Слика 4.5).

4.7.1.1. Како прајмер се користи олиго d-T, олигонуклеотидна секвенца која содржи само тимин

Оваа стратегија го искористува фактот дека молекулите на информациона РНК завршуваат со



Слика 4.5: Три начини на започнување на создавањето на кДНК: олиго дТ започнувач (прајмер), започнувач специфичен за дел од секвенцата на информациската РНК и случајно комбинирани хексамери.

поли А опашка. Олиго д-Т прајмерот ја препознава оваа секвенца и се врзува за неа. Ензимот реверзна транскриптаза ја започнува синтезата од самиот 3' крај на молекулата. На овој начин се произведува кДНК која потекнува само од информационата РНК бидејќи рибозомалната и транспортната РНК немаат поли А опашка.

4.7.1.2. Како прајмер се користат случајни хексамери

Случајаните хексамери се синтетизирани така што во секоја од 6-те позиции се наоѓа било кој од 4-те нуклеотиди. Овие куси прајмери теоретски можат да се врзат комплементарно на секоја една можна целна секвенца. На тој начин реверзната транскриптаза произведува кДНК вериги на секоја молекула РНК вклучително рРНК и тРНК.

4.7.1.3. Како прајмер се користи реверзниот прајмер од последователната ПВР реакција

Користењето на само еден прајмер овозможува синтеза на целна секвенца започнувајќи со регионот комплементарен на употребениот прајмер. Вака добиената кДНК може да се користи само за анализа на секвенцата која се наоѓа 5' во однос на секвенцата комплементарна на прајмерот.

Во оваа вежба опишуваме синтеза на првата кДНК

верига со употреба на ензимот реверзна транскриптаза ММЛВ користејќи олиго д-Т прајмер за синтеза на првата верига.

Во ПВР тубичка додади:

1. РНК	1-5 мг (во вкупен волумен 11 мкЛ)
2. олиго д-Т	1 мкЛ

Остави ја тубичката на 65^0Ц 5 мин, потоа префрли ја на мраз.

Во тубичката додади:

1. 4 х пуфер	5 мкЛ
2. 0.1М ДТТ	2 мкЛ
3. РНАсе ОУТ	1 мкЛ
4. ММЛВ	1 мкЛ

Остави ја тубичката на 37^0Ц 50 мин.

За синтеза на кДНК со користење на случајни хексамери како прајмер се користи следниот протокол:

Во тубичка за ПВР се додава:

1. РНК	3 мкЛ
2. дНТП (2.5 мМ)	8 мкЛ
3. случајни хексамери	1 мкЛ

Смешата се инкубира 5 минути на 80 степени по што во истата тубичка се додава:

4. ПВР пуфер 2	2 мкЛ
5. МуЛВ реверзна транскриптаза	1 мкЛ
6. РНК-зен инхибитор	1 мкЛ
7. $MgCl_2$ (25 мМ)	4 мкЛ

По инкубација од 4-5 минути на 42 степени, смешата се инкубира 15 минути на собна температура, по што инкубацијата на 42 степени се продолжува уште 45 минути, за на крај да се заврши со крајна денатурација од 5 минути на 95 степени.

4.8. ПВР

Полимераза верижната реакција која следи се изведува стандардно како што е опишано во Вежба 3: Полимеразно верижна реакција (ПВР).

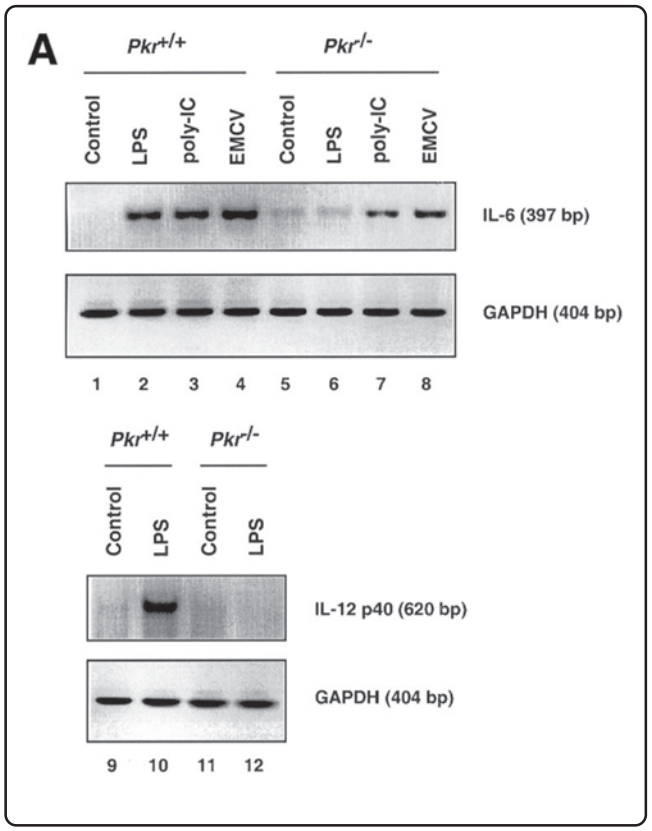
4.9. Задачи

4.9.1. Анализа на експресијата на ИЛ-6 и ИЛ-12 мРНК по стимулација со ЛПС или ЕМЦВ во нормални фибробласти и фибробласти нокаути за протеин киназа ПКР

Анализирај од Сликата 4.6 како се однесува експресијата на ИЛ-6 и ИЛ-12 мРНК по стимулација со ЛПС или ЕМЦВ во нормални фибробласти и фибробласти нокаути за протеин киназа ПКР.

На Слика 4.6 покажано е дека ИЛ-6 и ИЛ-12 мРНК се индуцибилни во култура од фибробласти по стимулација со бактериски липополисахарид (ЛПС) или вирус на енцефаломиокардитис (ЕМЦВ), а нивната транскрипција е во дел регулирана од п38 МАПК. ИЛ-6 е плеотропен цитокин кој го произведуваат различни типови од клетки, а се смета за главен регулатор на синтезата на протеини од акутната фаза во црниот дроб. ИЛ-12 е потентен активатор на цитотоксичните Т клетки и клетките природни убијци и силно се индуцира од бактериски липополисахарид (ЛПС), остварувајќи мост помеѓу вродениот и стекнатиот имун одговор. Експресијата на ИЛ-6 мРНК по стимулација со ЛПС или вирус на енцефаломиокардитис (ЕМЦВ) е намалена кај фибробласти нокаути за ПКР (Слика 4.6, траки 1 и 8), додека експресијата на ИЛ-12 е сериозно нарушена кај фибробласти нокаути за ПКР (траки 9 и 12). Експресијата на ГАПДХ е користена за нормализација на експресијата на ИЛ-6 и -12. Намаленото ниво на ИЛ-6 мРНК води до намалена продукција на ИЛ-6 во супернатантот во одговор на стимулациите. Очигледно е дека вродениот имун одговор е влошен кај фибробластите кога ПКР не е присутен.

Резултатите од анализата за експресијата на ИЛ-6 и ИЛ-12 мРНК по стимулација со ЛПС или ЕМЦВ во нормални фибробласти и фибробласти нокаути за протеин киназа ПКР од Слика 4.6 се внесуваат на Табела 4.1.



Слика 4.6: Протеин киназата ПКР е неопходна за активација на вродениот имун одговор кон бактериски ендотоксин преку создавање на ИЛ-6 и ИЛ-12.

Табела 4.1. Формулар за внесување резултати од експресијата на ИЛ-6 и ИЛ-12 мРНК по стимулација со ЛПС или ЕМЦВ.

	ИЛ-6		ИЛ-12	
Генотип	ЛПС	ЕМЦВ	ЛПС	ЕМЦВ
ПКР$^{+/+}$				
ПКР$^{-/-}$				

Дата _____

Студент _____

Асистент _____

ВЕЖБА 5. ДОЛЖИНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ НА РЕСТРИКЦИСКИ ФРАГМЕНТИ (ДПРФ)

5.1. Вовед

Во молекулската биологија, терминот должински полиморфизам на рестрикциски фрагменти (ДПРФ) или Restriction Fragment Length Polymophism (RFLP) се користи за две поврзани цели: како карактеристика на ДНК молекулите (настанати од различни нуклеотидни секвенци), според која може да се разликуваат, и како лабораториска техника која ги користи овие карактеристики за споредба на ДНК молекулите. Техниката се употребува во *генетски фингерпринтинг* и *тест на татковство*.

Методот на РФЛП, вообичаено вклучува екстракција и пурификација на ДНК од индивидуата. Пурифицираната ДНК се амплифицира со ПВР. Потоа ДНК молекулата се сече со **рестрикциски ензими** (ендонуклеази), кои ја сечат само онаму каде има специфични ДНК секвенци што ги препознава ензимот (означени како **рестрикциски места**) и се добиваат рестрикциски фрагменти. Рестрикциските фрагменти понатаму се сепарираат по должина со агарозна гел електрофореза, која може да се подобри со Southern blot техниката.

Растојанието помеѓу местата исечени со рестрикциските ензими (рестрикциски места) се разликува помеѓу индивидуите. Доколку два организми се разликуваат во растојанието помеѓу местата на сечење за одредена рестриктивна ендонуклеаза, должината на фрагментите ќе се разликува, што претставува полиморфизмот кај различните индивидуи. Тоа може да се искористи за генетско разликување на индивиуите, како и за анализа на генетска врска меѓу индивидуите, бидејќи децата ги наследуваат генетските елементи од своите родители. Исто така може да се користи за одредување на врската меѓу различните видови.

Разликите во должината на фрагментите произлегуваат од базни супституции, додавања, делеции или преуредување на секвенците преку препознатливите секвенци за рестрикцискиот ензим.

Иако две индивидуи од ист вид имаат скоро идентични геноми, тие секогаш се разликуваат во неколку нуклеотиди. Некои од овие разлики ќе продуцираат нови рестрикциски места или ќе ги отстранат, што може да се детектира со гел електрофореза или Southern blot технологијата. Колку индивидуите се помалку сродни, толку нивните ДНК секвенци се подивергентни и поверојатно е дека ќе се најде РФЛП. РФЛП е погоден за идентификција на видовите во популацијата. За детекција на РФЛП се користи раздвојување на фрагментите на гел електрофореза или Southern blot технологија и хибридизација со соодветни проби.

5.2. Рестрикциски ендонуклеази

Рестриктивен ензим или рестриктивна ендонуклеаза е ензим кој ја сече двоверижната ДНК молекула. Ензимот прави две засекувања, по една низ секој фосфатен скелет на двоверижниот ДНК хеликс без да ги оштети базите. Хемиските врски кои ги сече ензимот може повторно да се формираат со други ензими познати како *лигази*, така што рестриктивните фрагменти исечени од различни хромозоми или гени може да се поврзат, доколку нивните краеви се комплементарни. Многу од процедурите во молекулската биологија и генетското инженерство користат рестриктивни ензими.

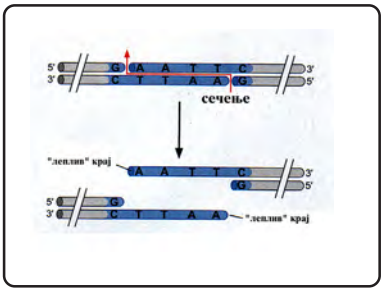
Терминот рестрикција доаѓа од фактот дека овие ензими биле откриени во соевите на *E. Coli* за кои се смета дека се рестриктивни на инфекција од одредени

бактериофаги. Рестриктивните ензими се верува дека се развиле како механизам за одбрана на бактериите од вируси и се мисли дека се дел од клеточната одбрана на бактериите од вирусите кои ги напаѓаат. Бактериските клетки не ја пресекуваат сопствената ДНК поради метилирање на нуклеотидите во рестриктивните позиции. Досега се откриени 500 рестриктивни ендонуклеази, од кои стотици се и комерцијално достапни за лабораторски цели.

5.2.1. Места на сечење

Рестриктивните ензими ги сечат двоверижните хеликсни сегменти кои содржат одредена специфична нуклеотидна секвенца, а засекувањето настанува само во секвенцата позната како **препознавачка секвенца** и тоа секогаш на ист начин.

Некои ензими прават засекувања непосредно еден спроти друг и создаваат ДНК фрагменти со **"blunt end"** или тапи краеви. Повеќето ензими прават нерамномерни засекувања и создаваат ДНК фрагменти со **"sticky ends"** или лепливи краеви од кои едната нишка протрудира. При дигестија на ДНК со рестриктивни ензими можни се неколку различни комбинации. Во биологијата, "sticky end" (кохезивен крај) или лепливите краеви и "blunt end" или тапите краеви се двете можни конфигурации кои настануваат со пресекување на двоверижната ДНК молекула. ДНК поседува стабилизирачка интеракција помеѓу комплементарните базни парови, што обезбедува специфичност на спарувањето на двете нишки од ДНК. Доколку комплементарните нишки на ДНК се со еднаква големина, тогаш тие ќе завршуваат со *тапи краеви* (Слика 5.1).



Слика 5.1: Рестрикциско расечување на ДНК со EcoRI при што се создаваат "лепливи краеви".

Пример:

5'-CTGATCTGACTGATGCGTATGCTAGT-3'
3'-GACTAGACTGACTACGCATACGATCA-5'

Сепак, доколку едната нишка надвиснува после комплементарниот регион, тогаш се вели дека ДНК протрудира ("overhang").

Пример:

5'-ATCTGACT-3'
3'-TAGACTGACTACG-5'

Доколку постои друг ДНК фрагмент со комплементарен протрудирачки дел ("overhang"), тогаш овие два протрудирачки краеви ќе настојуваат да се поврзат еден со друг, а за секоја нишка се вели дека има *лепливи краеви.*
Пример:

5'-ATCTGACT + **GATGCGTATGCT-3'**
3'-TAGACTGACTACG **CATACGA-5'**

Тие ќе формираат комплементарни базни парови:

5'-ATCTGACT**GATGCGTATGCT-3'**
3'-TAGACTGACTACG**CATACGA-5'**

Двата фрагменти понатаму може ковалентно да се поврзат со ДНК лигаза. Тапите краеви исто така може да се поврзат, но, реакцијата е значително побавна.

5.2.2. Комплементарност на фрагментите и поврзување

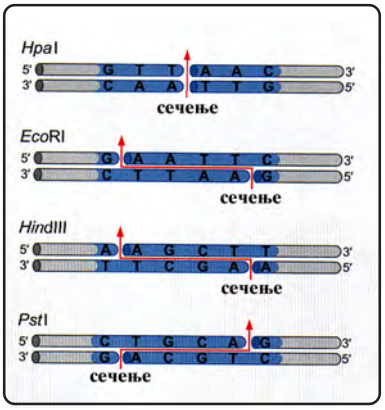
Бидејќи препознавачките секвенци и местата на сечење се разликуваат за различни ензими, должината и точната секвенца на лепливите краеви протрудира "overhang", а дали протрузијата е на 5'-крајот или на 3'-крајот на нишката зависи од ензимот кој ги создал. Базното спарување помеѓу надвиснатите краеви со комплементарни секвенци овозможува двата фрагменти да се поврзат со ДНК лигаза. Лепливите краеви може да се поврзат не само со фрагменти од кои тие оригинално се исечени, туку и со било кои други фрагменти кои имаат компатибилни лепливи краеви. Доколку рестриктивниот ензим има недегенерирано палиндромно место за сечење, сите краеви кои што ги создава ќе бидат компатибилни. Краевите кои се добиени од различни ензими исто така може да бидат компатибилни. Познавањето на местата за сечење им овозможува на молекуларните биолози да предвидат кои фрагемнти може да се поврзат и на кој начин, за да соодветно ги одберат ензимите.

5.2.3. Рестриктивни ензими како алатка

Рестриктивните ендонуклеази се ензими кои ја сечат молекулата на ДНК на специфични секвенци во зависност од употребуваниот ензим. Ензимите препознаваат места кои се со големина од 4-6 бп, дури и до 8 и 12 бп (слика 5.2). Општо земено, колку е пократка препознавачката секвенца, толку поголем број на фрагменти ќе се продуцираат. Бидејќи постојат многу комбинации во кои четирите нуклеотиди А, Ц, Г и Т може да се комбинираат во 4 или 8 или 12 нуклеотидни секвенци, препознавачката секвенца може да се појави во било која долга секвенца. Рестриктивните ензими специфични за стотици различни секвенци се идентификувани и се произведуваат за употреба во лабораториите. Според тоа, потенцијалните рестриктивни места може да ги има во речиси било кој ген или хромозом. Од друга страна, секвенците на некои артефициелни плазмиди содржат "linker" кој има многу препознавачки секвенци за рестриктивните ензими во многу мал сегмент од ДНК. Значи без разлика на содржината на генот, постои пар на рестриктивни ензими кои може да го отсечат и ќе продуцираат краеви што овозможуваат генот да се поврзе со плазмидот, што овозможува клонирање на генот.

Друга примена на рестриктивните ензими може да биде пронаоѓањето на специфичните (Single Nucleotide Polimorphisms) SNPs. Доколку се најде рестриктивен ензим кој може да исече само еден алел од ДНК (тоа значи дека одреден нуклеотид од SNP создава рестриктивно место), тој рестриктивен ензим може да се користи за генотипизирање на примерокот без потполно да се секвенционира примерокот. ДНК прво се сече со рестриктивна дигестија, потоа следи гел електрофореза на дигерираниот примерок. Доколку примерокот е хомозигот за чест алел, ќе се добијат два бенда на ДНК, бидејќи сечењето ќе се случи на рестриктивните места. Доколку примерокот е хомозиготен за редок алел, тогаш ќе се добие еден бенд, затоа што тој нема да биде исечен. Доколку примерокот е хетерозиготен за SNP, ќе се добијат три бенда на ДНК.

Додека препознавачките секвенци широко варираат, многу од нив се ***палиндромни.*** Тоа се позиции во ДНК молекулата кои имаат иста секвенца на двете комплементарни вериги кога се читаат од 5' во 3' насока и обратно.



Слика 5.2: Препознавачки секвенци и местата на сечење на неколку ендонуклеази.

5.2.4. Видови рестриктивни ензими

Биохемски, рестриктивните ензими се класифицирани во три вида, означени како тип I, тип II и тип III. Во тип I и III системите, метилазната и рестриктивните активности се изведуваат од единечен голем ензимски комплекс. Иако овие ензими препознаваат специфични ДНК секвенци, местата на сечење се со варијабилно растојание од овие препознавачки места и може да бидат оддалечени стотици бази. Во тип II системите, рестриктивниот ензим е независен од неговата метилаза, а сечењето се случува на специфични места кои се наоѓаат во или блиску до препознавачката секвенца. Најголем број на познати рестриктивни ензими се тип II, кои најмногу се употребуваат во лабораториите. Тип II ензимите понатаму се класифицираат врз основа на нивните препознавачки места. Тип II ензимите сечат симетрични ДНК секвенци, додека тип IIs асиметрични.

5.2.5. Именување

Рестриктивните ензими се именуваат според името на бактеријата од која се изолирани на следниов начин (*EcoRI*):

E	*Escherichia*	(род)
co	*coli*	(вид)
R	RY13	(сој)
I	Прв идентифициран кај бактеријата	

Табела 5.1: Примери за некои рестрикциски ензими, нивниот извор, препознавачките секвенци и обликот на сечење на ДНК.

Ензим	Извор	Препознавачка секвенца	Сечење
EcoRI	*Eschericia coli*	5′GAATTC	5'—G AATTC—3'
		3′CTTAAG	3'—CTTAA G—5'
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens*	5′GGATCC	5'—G GATCC—3'
		3′CCTAGG	3'—CCTAG G—5'
HindIII	*Haemophilus influenzae*	5′AAGCTT	5'—A AGCTT—3'
		3′TTCGAA	3'—TTCGA A—5'
TaqI	*Thermus aquaticus*	5′TCGA	5'—T CGA—3'
		3′AGCT	3'—AGC T—5'
*AluI**	*Arthrobacter luteus*	5′AGCT	5'—AG CT—3'
		3′TCGA	3'—TC GA—5'

* = лепливи краеви

5.2.6. Примери

Примери зан некои рестрикциски ензими се дадени на Табела 5.1.

5.3. Изведување на вежбата

5.3.1. Потребен материјал

- **Реагенси:**
  - 10x пуфер за дигестија
  - рестриктивен ензим
  - ДНК примерок
  - Стерилна вода
- **Опрема:**
  - Водена бања на 37°Ц

5.3.2. Стандарден протокол

5.3.2.1. Единечна дигестија

Во тубичка од 1.5 мЛ додади:

1. 2 мкЛ од соодветниот 10x пуфер на рестриктивниот ензим

2. 0.1 - 5 мкг ДНК

3. стерилна вода до вкупен волумен од 19 мкЛ *(Забелешка: Овие волумени се само за аналитички дигести. Поголеми волумени може да се потребни за препаративни дигести).*

4. Додади 1 - 2 мкЛ (3 до 20 единици) од ензимот и нежно промешај.

5. Инкубација 1-2 часа на соодветна температура (вообичаено 37°Ц).

5.3.2.2. Преципитација на дигестираната ДНК

6. Запри ја реакцијата со додавање на 5 M NaCl до конечна концентрација од 0.25 M NaCl.

7. Додади 2.5 волумени етанол, промешај стави го на -80°Ц за 30 минути или на -20°Ц преку ноќ. Преципитираната ДНК може да се чува со етанол на -20°Ц неограничено време.

8. Раствори ја преципитираната ДНК во волумен на ТЕ-пуфер со pH= 8.0 кој е соодветен за агарозниот гел. Обичное доволно 20 мкЛ од ТЕ и 5 мкЛ од 5 x SGB (sample gel buffer). Растворањето трае 2-3 часа. Најдобро прво да се раствори ДНК во ТЕ pH=8.0, а потоа да се додаде 5 x SGB.

5.3.2.2. Двојна дигестија

Треба да се погледне во картата за пуфери за ензимите и да се провери активноста на ензимот за различни пуфери. Доколку може да се најде пуфер кој

овозможува двата ензими да работат со >75% од нивната максимална активност, тогаш дигестијата може да се изведе симултано во компатибилниот пуфер. Доколку не може да се најде компатибилен пуфер, тогаш дигестиите треба да се изведат една по друга. Тоа значи: прва дигестија со соодветниот пуфер за ензимот; преципитација на ДНК со етанол, ресуспендирање на дигестираната ДНК во стерилна вода и изведување на втората дигестија со соодветниот пуфер за тој ензим.

Проверка на дигестираните фрагменти се врши со електрофореза на 3% агарозна гел обоен со етидиум бромид.

5.3.2.3. Посебни услови:

За некои ензими потребни се посебни услови, што е наведено во комерцијалниот каталог. Некои имаат потреба од говедски серум албумин да се додаде во смешата. За други се потребни слаби детергенти (пр. Тритон-X-100) за да се намали површинскиот полнеж, додека за некои е потребно да се инкубирааат на температури различни од 37°Ц (пр.50°Ц).

5.3.2.4. Стар активност

Заради неоптимални услови, високата концентрација од ДНК или магнезиумови јони се јавува *Стар активност* која означува дека ензимот сече на места кои не се специфични за него. На пример *Eco*RI се претпоставува дека ја сече само секвенцата GAATTC, но под одредени екстремни услови може да ја сече и секвенцата CAATTC.

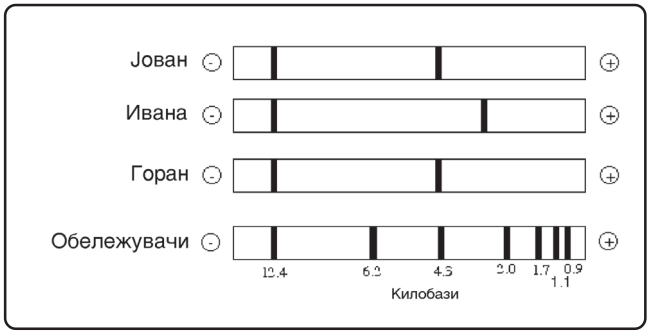
5.4. Примени

5.4.1. Детекција на точкасти мутации со ДПРФ или ПВР амплифицирана ДНК секвенца

За разлика од методите кои се користат за скенирање на мутации (RNase A, DGGE, SSCP), а не можат да го одредат точното место на точкастата мутација, ПВР/ДПРФ методот овозможува детекција и карактеризирање на точкастата мутација. Откако геномската секвенца е амплифицирана со ПВР, со создавањето или деструкцијата на рестриктивните места се овозможува брза детекција на точкастите мутации. Многу точкасти мутации не создаваат или не го укинуваат рестриктивното место и заради тоа не можат да се детектираат со оваа техника. Сепак, можна е примена на ПВР започнувачи кои можат да креираат ново рестриктивно место за одреден ензим.

5.4.2. Докажување на татковство

РДПРФ технологијата може да се користи при докажување на татковството. Пример: Да се одреди дали Јован е татко на детето на Ивана со име Горан. Во ова сценарио, ДНК е изолирана од леукоцити од сите 3 идивидуи и подложена на РФЛП анализа. Резултатие се следните (Слика 5.3):



Слика 5.3: Докажување на татковство.

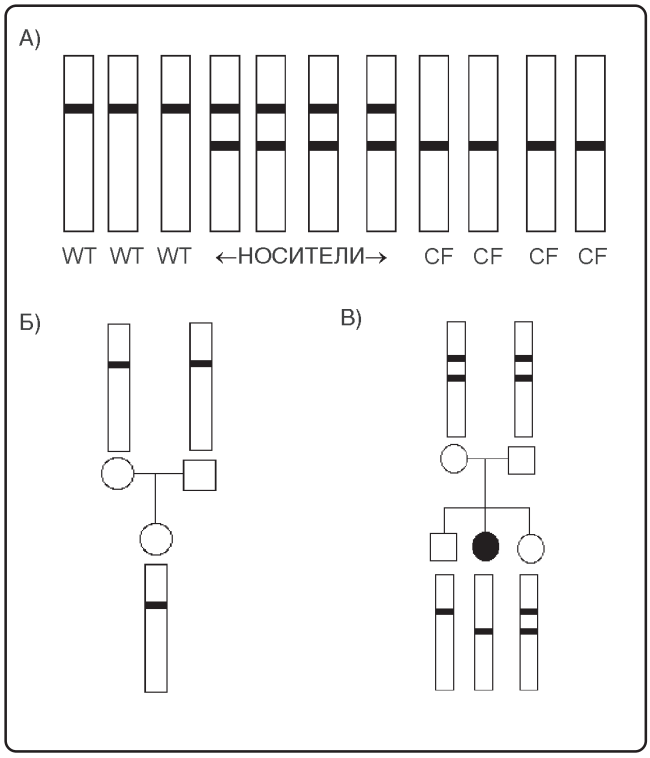
Коментар: Јован е можен татко, бидејќи Горан го наследил фрагментот 12.4 кб од Ивана и фрагментот 4.3 кб од Јован. Сепак, постои можност дека и друг човек може да има сличен ДПРФ. За да се добие посигурен резултат се тестираат многу повеќе локуси на ДПРФ. Мала е веројатноста дека двајца мажи (со исклучок на идентични близнаци) ќе имаат ист ДПРФ за голем број на локуси, па во тој случај татковството може да се докаже.

5.4.3. Анализа на наследување на болести

5.4.3.1. Скрининг за цистична фиброза

Во генетското советување на брачните парови се користи ДПРФ техниката за одредување на носителите и заболените од цистична фиброза (ЦФ), кое

овозможува да се предвиди пренесувањето на алелите на потомството. Во овој пример, сакаме да откриеме дали испитаникот е носител на алел за ЦФ. Цистична фиброза е автозомно рецесивно заболување, што значи дека пациентот со ЦФ мора да биде хомозигот за двата алела. Од информациите во педигрето, може да се одреди кој е носител на алелот за ЦФ во фамилијата. Познати се фрагментите за ЦФ, што овозможува да се одреди дали испитаникот е хомозигот за нормалниот алел, хетерозиготен носител или хомозигот за алелите на ЦФ, а со тоа и болен од ЦФ (Слика 5.4).

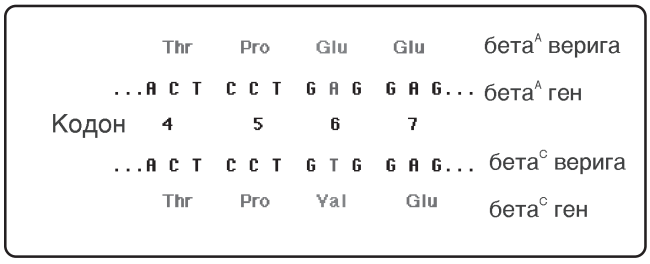


Слика 5.4: ДПРФ анализа за цистична фиброза (А); Брачен пар хомозиготи за нормалниот алел (Б); Брачен пар хетерозиготни носители на генот за ЦФ (В).

Коментари: Доколку брачниот пар кој очекува потомство се хомозиготни за нормалниот алел, тогаш сите нивни деца ќе бидат хомозиготни за нормалниот алел (Слика 5.4(Б)). Доколку двата родители се хетерозиготни, нивните деца може да имаат било кој од трите горенаведени генотипови, но хетерозиготните генотипови се секогаш два пати почести отколку било кој хомозиготен генотип (Слика 5.4(В)).

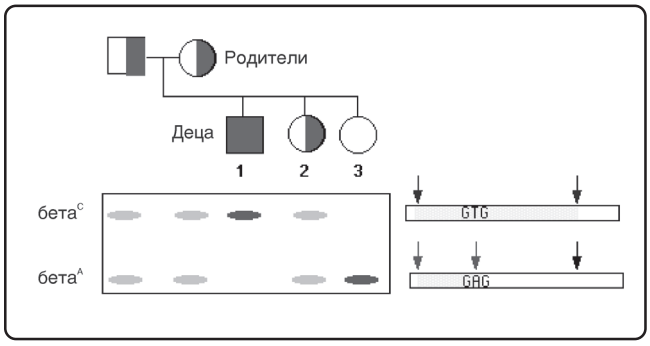
5.4.3.2 Скрининг за српеста анемија

Српеста анемија е генетско заболување кое припаѓа на групата хемоглобинопатии. Изменетите бета вериги во двата гена кодираат аминокиселина валин (Вал) на шесттата позиција на бета веригата (бета^C) од хемоглобинската молекула, додека нормалните бета вериги (бета^A) имаат глутамин на таа позиција (Слика 5.5). Единствена разлика помеѓу двата гена е супституција на нуклеотидите Т со А во кодонот 6. При тоа кодонот **GAG** за глутамин се менува во **GTG** кое ја кодира аминокиселината валин; се укинува секвенцата **CTGAGG** која се наоѓа во кодоните 5, 6 и 7, која ја препознаваат рестриктивните ензими.



Слика 5.5: Разлика помеѓу нормалната бета верига (бета^A) од хемоглобинската молекула и бета веригата кај српеста анемија (бета^C).

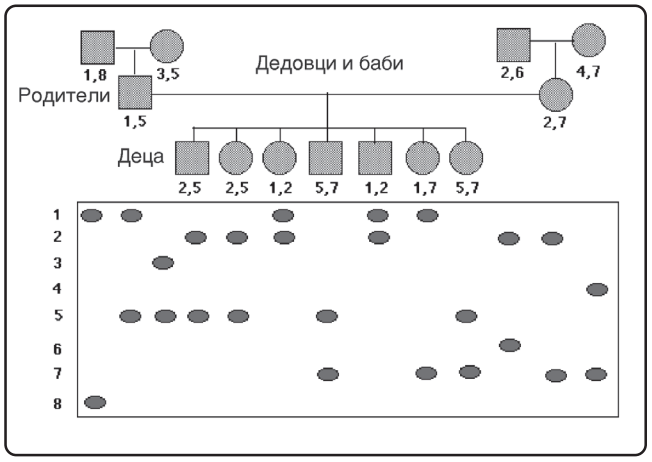
Кај нормалниот ген (бета^A) при сечење со рестриктивните ензими се добива помал фрагмент, додека кај генот за српеста анемија заради губење на секвенцата која ја препознава рестриктивниот ензим се добива поголем фрагмент (Слика 5.6).



Слика 5.6: Разлики во рестриктивните фрагменти кај нормалниот и генот за српеста анемија. Во овој пример, промената во единечен нуклеотид доведува до ДПРФ, а овие полиморфизми се познати како single nucleotide polymorphisms (SNPs). (Напомена: сите ДПРФ не потекнуваат од SNPs.)

5.4.3.3 Скрининг за ДПРФ маркер

Доколку одреден ДПРФ е секогаш поврзан со одредена генетска болест, тогаш присуството или отсуството на тој ДПРФ може да се користи за да се открие ризикот за развој или пренесување на болеста. Се претпоставува дека доколку генот кој е од интерес е лоциран блиску до ДПРФ, тогаш присуството на ДПРФ може да служи како показател за самиот ген носител на болеста. Сепак, заради ***кросинг овер,*** кој настанува во првата мејотична делба, ДПРФ кај некои луѓе може да биде поврзан со мутантниот ген, а кај други со нормалниот алел. Затоа, неопходно е да се испитува не само пациентот, туку колку што е можно повеќе членови од фамилијата (Слика 5.7).



Слика 5.7: ДПРФ како маркер за болести.

Коментар: Педигрето покажува пренесување на ДПРФ маркер преку 3 генерации во една фамилија. Во оваа фамилија анализирани се вкупно 8 алели. Ако секој кој го наследува ДПРФ со број 2 има одредена наследна болест, а оној кој го нема ДПРФ со број 2 го нема наследното заболување, тогаш може да заклучиме дека генот за болеста е блиско поврзан со овој ДПРФ. Ако родителите се одлучат да имаат потомство, пренаталното тестирање може да помогне во предвидувањето дали детето ќе има склоност да развие болест.

Сепак, кросинг овер во тек на формирањето на гаметите може да го помести ДПРФ на здравиот алел. Значи, колку е поголема дистанцата помеѓу ДПРФ и генскиот локус, помала е можноста за точна дијагноза.

5.5. Задачи

5.5.1. Да се одредат мутациите на C282Y за хемохроматоза со ДПРФ

Мутациите за C282Y за хемохроматоза со ДПРФ протоколот се определуваат според долната шема (Табела 5.2).

Табела 5.2: Протокол за полимеразно верижна реакција за определување мутации на егзон 4 од генот за хемохроматоза.

Реагенси	за 1 примерок	за n - примероци
1. Стерилна вода	65.0 мкЛ	
2. HFE-1 100 p/мкЛ	0.5 мкЛ	
3. HFE-2 100 p/мкЛ	0.5 мкЛ	
4. 10 x PCR-B	10.0 мкЛ	
5. $MgCl_2$ 25 мМ	8.0 мкЛ	
6. 4 x dNTP 2,5 мМ	8.0 мкЛ	
7. Taq gold 5 μ/ мкЛ	0.5 мкЛ	
8. ДНК	5.0 мкЛ	
Вкупен волумен	100 мкЛ	

Амплификацијата на егзон 4 од генот за хемохроматоза се врши според Табела 5.3.

Табела 5.3: Протокол за амплификација на егзон 4 од генот за хемохроматоза.

	Температура	Време
• Иницијална денатурација	95°Ц	10 мин
• 40 циклуси:		
Денатурација	95°Ц	1 мин
Прилепување	63°Ц	1 мин
Екстензија	72°Ц	1 мин
• Крајна екстензија	95°Ц	10 мин

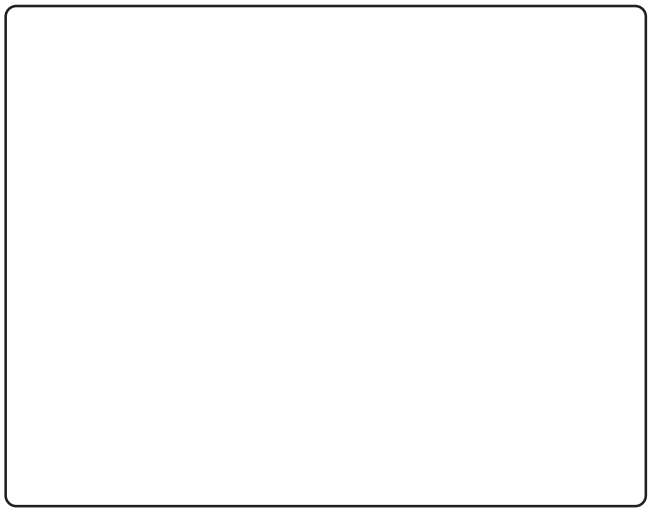
Дигестија на ХФЕ егзонот 4 со рестриктивниот ензим *Rsa*I се врши според Табела 5.4. Дигестијата се изведува на 37°Ц, 16 часа.

Табела 5.4: Протокол за дигестија на егзон 4 од генот за хемохроматоза со *Rsa*I.

Реагенси	за 1 примерок	за n - примероци
1. Стерилна вода	2.0 мкЛ	
2. NEB - 1	2.5 мкЛ	
3. Rsa I 10 Е/мкЛ	0.5 мкЛ	
4. HFE ex 4	20.0 мкЛ	
Вкупен волумен	25.0 мкЛ	

5.5.2. Толкување на резултатите

Анализа на лентите од агарозниот гел се врши од фотографијата на Слика 5.8 и се внесуваат во Табела 5.5.



Слика 5.8: Место за фотографија од агарозна гел електрофореза после ДПРФ на мутацијата на ХФЕ генот.

Табела 5.5: Анализа на лентите од агарозната гел електро-фореза после ДПРФ на ХФЕ генот.

Лента 1		Лента 5	
Лента 2		Лента 6	
Лента 3		Лента 7	
Лента 4		Лента 8	

Дата Студент Асистент

_____ _____ _____

ВЕЖБА 6. ССП (SEQUENCE-SPECIFIC PRIMING) МЕТОД

6.1. Вовед

Една од денеска најчесто употребуваните методи за молекулско типизирање е методата во која се користат прајмери специфични за определени секвенци (SSP - sequence-specific priming). Таа се базира на принципот дека само олигонуклеотидните започнувачи (прајмери) кои се комплетно идентични со испитуваната секвенца, во строго контролирани услови, би се врзале за денатурираната ДНК, при што би се постигнала ефикасна ПВР амплификација (позитивен резултат). При употребата на започнувачи кај кои нема совршено совпаѓање, нема да настане хибридизација, поради што нема да настане ни амплификација (негативен резултат).

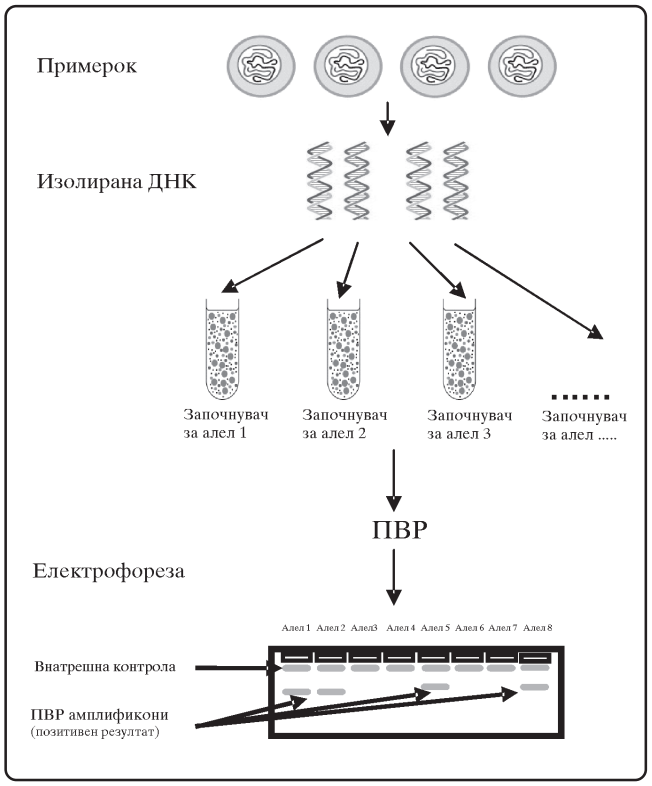
Парот на специфични започнувачи кои се употребуваат во оваа метода се дизајнирани на начин кој овозможува нивно комплетно совпаѓање со 5'- и 3'- крајот (со што се овозможува специфично амплифицирање), на саканата полиморфна секвенца на еден определен алел или група на алели. Дискриминацијата помеѓу алелите, која се случува во текот на *ин витро* амплификацијата, во голема мера ги сведува постамплификациските (неспецифичните) реакции на минимум.

Со оглед на фактот дека секој пар на започнувачи идентификува две различни секвенци на еден хромозом, овој метод се одликува со висок степен на резолуција. Бидејќи амплификацијата во ПВР е зависна од голем број на фактори (на пр. грешки во пипетирање, слаб квалитет на ДНК, присуство на инхибитори и друго), како позитивна контрола во овој метод, се наоѓа и пар на започнувачи со кои се амплифицира сосема различен дел на ДНК. Таа се наоѓа во истата тубичка во која се наоѓаат и специфичните започнувачи. Најчесто како позитивна контрола се употребува пар на започнувачи кои го амплифицираат генот за хуманиот β-глобулин или Ц-реактивниот протеин.

Во ССП методот неможат да се употребуваат било кои и било какви започнувачи. Во текот на стандардизација на оваа метода потребно е да се тестираат различни комбинации на започнувачи. Тие се тестираат на материјал со веќе познати карактеристики (најчесто на клеточни линии препорачани од ХЛА работилницата). Во случајот да постои само еден алтернативен започнувач, на пр. поради постоење на само еден различен нуклеотид помеѓу два алели, специфичноста на започнувачите може да се зголеми или со зголемување на нивната должина или со вметнување на одредено несовпаѓање на неколку нуклеотиди пред 3'-крајот. Денеска во светот постојат неколку комерцијални фирми кои се занимаваат со дизајнирање и продажба на започнувачи.

Во текот на доволен број на циклуси и при ниска температура на анилирање, започнувачите би можеле да амплифицираат било кој примерок од ДНК. Параметрите за ПВР се избрани на начин со кој би се избегнало било какво неспецифично амплифицирање.

Испитуваната ДНК (геномската ДНК во која се испитува постоењето на одредени сегменти) се додава во тубичките во кои веќе се наоѓаат започнувачите и сите останати компоненти неопходни за ПВР реакција (на пр. ДНК полимераза, пуфер, Mg^{2+}) (Слика 6.1). Откога ќе се додаде испитуваната ДНК, тубичката се става во топлотен циклер и се подложува на ПВР. Продуктот од ПВР се нанесува на агарозен гел со цел да се раздвојат амплифицираните сегменти од ДНК. По електрофорезата, амплификатите на ДНК се визуелизираат со боење (најчесто со етидиум бромид) и изложување на ултравиолетно светло.



Слика 6.1: Молекулско типизирање со помош на ССП (sequence-specific priming) методот.

Толкувањето на резултатите се врши врз основа на присуството на продуктот во внатрешните контролни започнувачи и врз основа на присуството или отсуството на продуктот во специфичните започнувачи. Во присуство на специфична амплификација, резултатот на амплификацијата од контролните започнувачи може да е слаб или отсутен. Ова се јавува поради разликите во концентрацијата и "мелтинг" температурата помеѓу контролните и специфичните започнувачи. Амплификатите кои се резултат од специфичните започнувачи вообичаено се помали од амплификатите кои се резултат на контролните започнувачи. Типизирањето со помош на ПВР-ССП методот во голема мера ги истиснува серолошките методи во рутинската клиничка пракса.

Понекогаш, со цел да се зголеми осетливоста на техниката, во пуферот за ПВР се додава глицерол. Ова особено важи во случаите кога сакаме да ја типизираме I класа од главниот ткивно совпадлив комплекс (ГТСК). Тогаш концентрацијата на глицеролот треба да изнесува 5-7%. За разлика од I класа, типизирањето на II класа на ГТСП не е така осетливо. Тука, за оптимална амплификација на сите смеши на започнувачи, концентрацијата на глицеролот може да се движи од 0-10%. Понекогаш, за да се заштеди во време, во смешата за ПВР пред да се пушти на амплификација, се додава и бојата крезол црвено. Оваа боја не смета на ПВР реакцијата. Бојата, заедно со глицеролот, ќе го направи непотребно додавањето на полнечки ("loading") пуфери пред да се пушти примерокот на електрофореза.

Присуството од комбинацииите на позитивни и негативни реакции се користи во дефинирањето на алелот присутен во геномската ДНК. Доколку на електрофорезата не се појават продукти на специфичните и внатрешните контролни започнувачи, најверојатно се работи за техничка грешка. Тогаш потребно е да се повтори целата постапка. Бројот на започнувачите кои се користат во еден тест, зависи од локусот кој се испитува и степенот на резолуција кој сака да се постигне. На пример, при испитување на ХЛА-ДРБ локусот со ниска резолуција, се користат околу 20 до 30 пара на започнувачи, додека за високорезулутивно испитување на А, Б и Ц локусите се користат околу 100 до 200 пара на започнувачи. Со зголемување бројот на алелите на еден локус се зголемува и бројот на започнувачите кои треба да се употребат за негово одредување. Варијациите во овој метод вклучуваат и употреба на мултиплекс ПВР и употреба на различни техники за детекција на позитивните реакции (на пр. хибридизација со обележени проби).

Предности на ССП. Една од предностите на ПВР-ССП методот е и можноста полиморфизмите да се детектираат во ***CIS*** положба, при што се избегнува влијанието на алелите кои се наоѓаат на другиот хромозом. Ова е од непроценлива важност во случаите кога се работи за откривање нови алели, особено кога се работи за комбинации на две веќе познати секвенци. Во овие случаи новите алели неможат да се разликуваат од веќе познатите во хетерозиготните комбинации. Во главните предности на овој метод спаѓаат и краткото време потребно за негово изведување, минималната количина на потребна опрема и неговото релативно лесно совладување. Краткото време потребно за неговото изведување, го прави овој метод погоден за рутински клинички испитувања.

Недостатоци на ССП. Главните недостатоци на ПВР-ССП методот се потребите од релативно голем број на

реакции (започнувачи) и ДНК со голема чистота, за да се обезбеди специфичноста на реакцијата. Една од слабостите на оваа метода, доколку се употребува за ХЛА типизирање, е и недостатокот од соодветни внатрешни контроли. Поради ова, доколку внатрешната контрола (различен пар на започнувачи) е позитивна, а ХЛА-специфичните започнувачи се нефункционални, можно е да се добие лажно негативен резултат. Иако е теоретски можно да се создадат соодветни внатрешни контроли, тоа досега сеуште не е направено.

6.2. Електрофореза на ДНК фрагменти

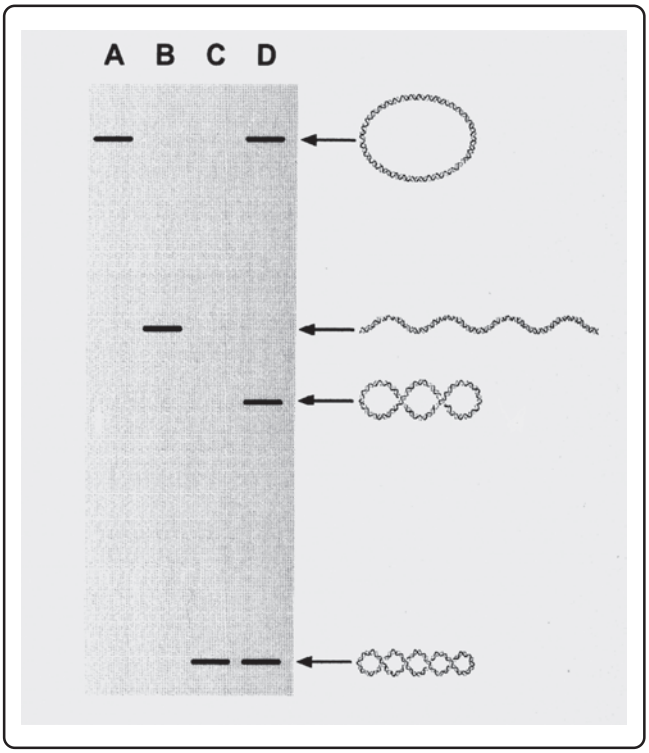
6.2.1. Општо за електрофореза

За карактеризирање на примероците на ДНК и РНК често пати се употребува електрофорезата. Таа е интегрален дел од повеќето стратегии во кои е вклучена карактеризација и манипулација со нуклеински киселини. Функционира преку механизам сличен на продирањето на молекулите низ решетка. Поради нето негативниот полнеж од фосфатните групи сместени долж осовината на ДНК и РНК молекулите, нуклеинските киселини патуваат кон анодата кога ќе се најдат во електрично поле.

6.2.1.1. Параметри кои влијаат на брзината на патувањето на ДНК молекулите

Големина на молекулите од ДНК. Поради специфичната конформација, кога ќе се најдат во електрично поле, брзината на движењето на молекулите на линеарната двојноверижна ДНК е обратнопропорционална од логаритамот на нивната молекулска маса. Аналогно на тоа, молекулската маса на непознатите ДНК фрагменти може да се одреди преку споредувањето на нивната подвижност со подвижноста на стандардите со позната молекулска маса.

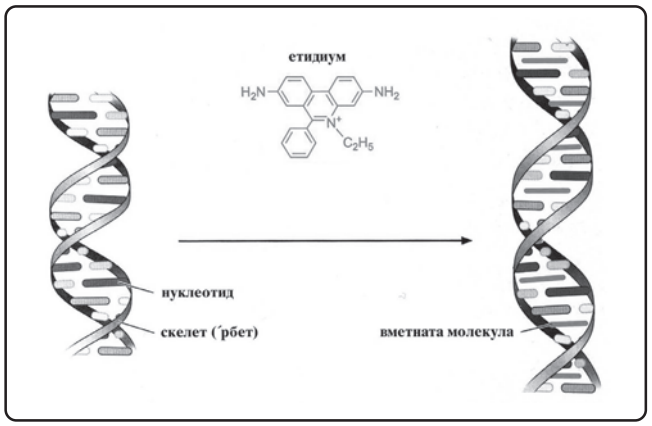
Конформација на ДНК. Соодносот помеѓу големината и брзината на движењето е многу покомплицирана кога молекулите на ДНК не се линеарни или се едноверижни. Молекулите на ДНК со затворена кружна (форма I), прекината кружна (форма II) и линеарна дуплекс (форма III) форма и покрај тоа што имаат иста молекулска маса, во електрично поле патуваат со различна брзина. Брзината на патувањето на кружните молекули зависи од степенот на извитканост на хеликсот (Слика 6.2). Молекулите на ДНК во форма на затворен круг, кои покажуваат типична негативна суперсвитканост, патуваат многу побрзо од линеарните молекули или од молекулите во форма на прекинат круг. Молекулите на ДНК во форма на прекинат круг, од друга страна, патуваат многу поспоро од линеарните молекули (без разлика на нивната должина). Иако подвижноста на сите фрагменти се намалува со додавањето на етидиум бромид во гелот, овој ефект е најизразен кај негативната суперизвиткана ДНК.



Слика 6.2: Шема на електрофоретско двоење на различни топоизомери од ДНК.

Етидиум бромидот го намалува негативниот суперхеликс кај молекулите со форма I, при што се зголемува нивниот радиус. Зголемувањето на радиусот ќе доведе до намалување на подвижноста. Со зголемување концентрацијата на етидиум бромидот, сите негативни форми на суперхеликс

омлитавуваат. Доколку се додаде уште повеќе етидиум бромид, ќе дојде до појава на позитивно наелектризирани свиткувања во суперхеликсот, што ќе резултира со поголема компактност на молекулите на ДНК и рапидно зголемување на нивната подвижност (Слика 6.3).



Слика 6.3: Вметнување на молекулата од етидиум бромид во молекулата на ДНК ,

Едноверижните молекули на ДНК и РНК во растворите покажуваат во голема мера секундарна структура. Степенот на оваа секундарна структура зависи од многу фактори, вклучувајќи ја тука и температурата, основната структура и составот на пуферот. Варијабилноста на секундарната структура и нејзиниот ефект врз електрофоретската подвижност ја оневозможува точната споредба на должината на фрагментите. Поради тоа, должината на фрагментите на едноверижните молекули (ДНК или РНК) се одредува со електрофореза на денатурирачки гелови (на пр. гел кој се користи кај ДНК секвенционирањето или геловите кои се користат кај Нордерновото дамкосување), кои ја елиминираат секундарната структура.

Волтажа. При ниска волтажа брзината на движењето на кратките (<2000 бп) и долгите линеарни ДНК фрагменти е правопропорционална со нивната должина. Ваквата линеарна зависност не важи кога многу долгите фрагменти ќе се подложат на висока волтажа, што доведува и до намалување квалитетот на резолуцијата. Овој ефект е најизразен кај електрофорезата со пулсно-поле.

Состав на матриксот. Решеткастите карактеристики на гелот зависат како од составот така и од концентрацијата на неговиот матрикс.

а) *Полиакриламидната гел електрофореза (ПАГЕ).* ПАГЕ е попогодна за анализа на помали фрагменти. Со 6% полиакриламиден гел лесно можат да се анализираат фрагменти кои се рзаликуваат во 1 бп, доколку нивната вкупна должина не надминува 300 бп. Полиакриламидот (во мономерна форма) најчесто се чува како 40% шток раствор помешан со бисакриламид, во однос 19:1. ТЕМЕД и амониум персулфат се додаваат непосредно пред почетокот на полимеризацијата.

Предности на ПАГЕ:

- Може да ги раздвои молекулите кои должински се разликуваат за 0.2% (на пр. 1 бп на 500 бп).

- Можат да се раздвојуваат многу мали фрагменти.

- Можат да се раздвојуваат големи количини од ДНК без да се изгуби во резолуцијата: до 10 мкг на поединечен фрагмент на ДНК може да се нанесе во отворите (со стандардна големина 1цм х 1мм) н а гелот.

- Изолатите на ДНК кои ќе се добијат од полиакриламидниот гел се неконтаминирани и спремни за употреба во понатамошните техники на работа (на пр. внесување во глувчешки ембриони).

Недостатоци на ПАГЕ:

- Мономерната форма е невротоксична.

- Релативно тежок начин на припрема и работа со ваквиот вид на гелови.

б) *Агарозна гел електрофореза.* Агарозата е матрикс на избор при работа со фрагменти на ДНК со должина од 500 бп до 10 Мб. Фрагментите на ДНК со различна должина во агарозниот гел патуваат со различна брзина. Поради тоа, со внимателен избор на концентрацијата на гелот, ни е овозможено оптимално раздвојување на саканите фрагменти од ДНК. Останатите предности на агарозата се:

- Геловите се цврсти и со нив може да се работи и во хоризонтална положба. Ваквото нешто ни овозможува следење и проценка на електрофорезата во секој момент на нејзиното траење.

- Агарозата не е токсична.

- Новите видови на агароза главно не содржат инхибитори. Некои од нив можат да ги раздвојат фрагментите кои се разликуваат во должината по 10 бп.

в) *Hydrolink™*. Нов вид на матрикс кој поседува

специјални карактеристики. Еден вид од овој матрикс поседува посебни карактеристики на пакување, што овозможува раздвојување на повеќе базни парови на единица должина во споредба со конвенционалните акриламидни гелови. Друг вид од овој матрикс поседува карактеристики кои овозможуваат подобро раздвојување на молекулите со различна просторна конформација. Трет вид на овој матрикс, поради своите карактеристики, овозможува појасно раздвојување на многу малите фрагменти на ДНК. Врз основа на сето ова може да се каже дека изборот на матриксот и неговата концентрација ќе зависи од големината на фрагментите кои сакаме да ги раздвоиме.

Пуфери за електрофореза. Најчесто употребувани пуфери се ТБЕ (Трис-борат-ЕДТА) и ТАЕ (Трис-ацетат-ЕДТА). Иако овие пуфери имаат незначително различен ефект врз подвижноста на ДНК фрагментите и на резолуцијата, нивниот избор зависи од нивниот релативен пуферски капацитет. ТБЕ поседува значително подобар пуферски капацитет и е пуфер на избор кај електрофорезата со пулсно поле или кај високо-волтажната електрофореза. Од историски причини, сеуште најчесто употребуван пуфер кај рутинската електрофореза е ТАЕ.

Количина на примерокот на ДНК кој се нанесува. Минималната количина на ДНК која може да се прикаже (визуелизира) со етидиум бромид е 5 нг. Во едно бунарче со стандардна големина (0.5 цм широчина и 0.2 цм длабочина) може да се нанесе до 200 нг единечен ДНК фрагмент. Доколку се нанесе поголема количина ќе дојде до прелевање. Прелевањето ќе доведе до појава на опашки, искривување на траките и намалување на подвижноста. Овие ефекти се посебно изразени кај фрагментите на ДНК поголеми од 10 Кб. Концентрацијата на NaCl во примерокот има мал ефект. Една од предностите на акриламидот и Hydrolink™ гелот е можноста поголеми количини од ДНК да се нанесат во бунарчињата, без да настане прелевање.

6.2.1.2. Следење на електрофорезата

Во полнечкиот (loading) пуфер, со цел да се следи напредувањето на електрофорезата (до каде е стигнато со раздвојувањето на фрагментите), се додава боја за следење. Двете најчесто употребувани бои, бромфенол сино и ксилен цијанол, поседуваат различна електрофоретска подвижност. Со кои од фрагментите тие ќе патуваат, зависи од видот на матриксот и од неговата концентрација. Двата најчесто употребувани матрикси се:

- 1% агароза: ксилен цијанол ~5кб, бромфенол сино ~0.5 кб.

- 5% акриламид: ксилен цијанол ~260 бп, бромфенол сино ~60 бп.

Во агарозните гелови често се додава и етидиум бромид, бидејќи тој овозможува директна визуелизација на ДНК. Оваа боја се вметнува помеѓу базите и флуоресцира црвенкасто-портокалово при изложувањето на УВ светло (260-360 нм) (Слика 6.3). Ефектот на етидиум бромидот врз подвижноста на линеарната ДНК е незначителен. Во овие случаи, со неговото додавање во гелот, овозможуваме постојано следење на процесот на раздвојување на фрагментите во текот на електрофорезата. Етидиум бромидот може да се искористи и за одредување концентрацијата на фрагментите на ДНК, преку споредување на нивната флуоресценцијата со флуоресценцијата на познато количество на ДНК.

6.2.1.3. Обележувачи за молекулска тежина

Во најголемиот број на гелови една од лентите содржи скала (ладер), составен од ДНК фрагменти со позната должина. Изборот на овие обележувачи зависи од големината на фрагментите кои треба да ги раздвоиме. Од релативната позиција на познатите маркери може да се конструира стандардна крива, која потоа ќе се користи за одредување големината на непознатите фрагменти. Сепак, многу често, големината на непознатите фрагменти се одредува со споредување на далечината на нивното патување, во однос на далечината на патувањето на познатите фрагменти.

6.3. Изведување на вежбата

6.3.1. ССП метод

6.3.1.1. Потребен материјал за изведување на вежбата

За изведување на ССП методот неопходни се:

- Примерок од ДНК.

- Пластичен носач од 96 ведренца исполнет со лиофилизирани започнувачи.
- 140 мкЛ пуфер за ПВР.
- Затварач за пластичен носач.
- Так ДНК полимераза.
- Стерилна вода.
- Микропипетори и пластични продолжетоци.
- Топлотен циклер (сајклер) способен да носи 96 ведренца.
- 1Х ТАЕ пуфер за електрофореза.
- Латекс ракавици за еднократна употреба.

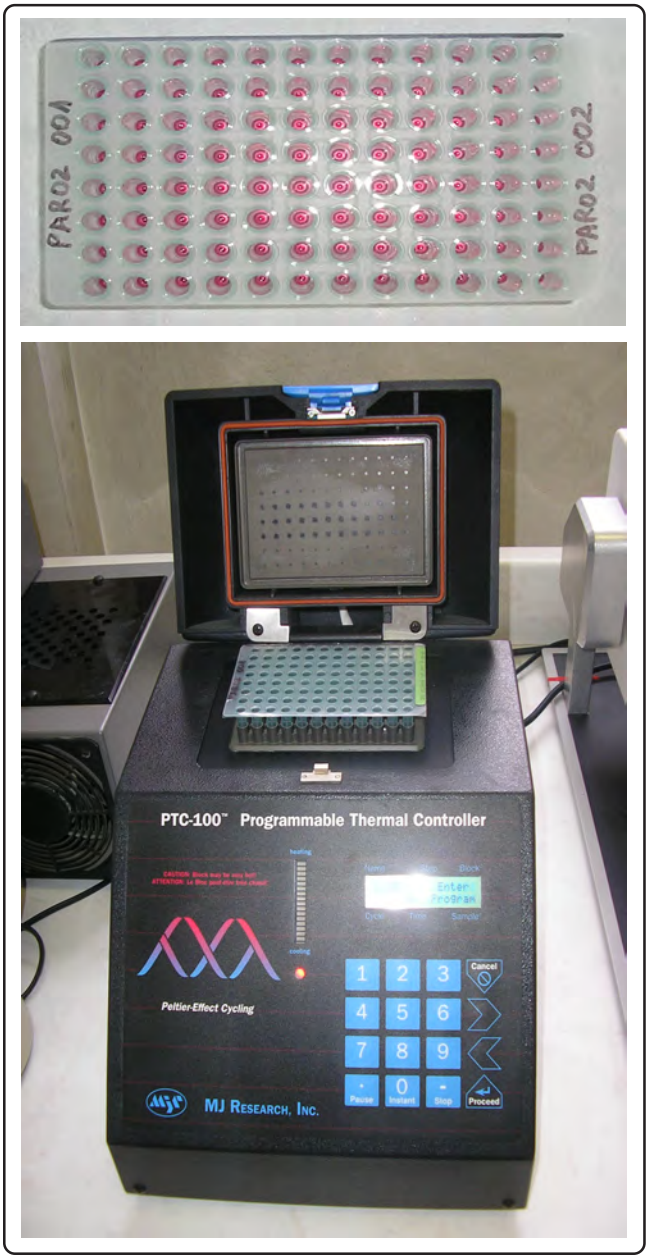
6.3.1.2. Протокол за работа

Пластичниот носач од 96 ведренца исполнет со лиофилизирани започнувачи и пуферот за ПВР се вадат од ладилник и се оставаат на собна температура 10-15 минути. Потоа во пуферот се додаваат 370 мкЛ стерилна вода, 4 мкЛ Так полимераза и 8 мкЛ ДНК. Так ДНК полимеразата и примерокот од ДНК се чуваат во фрижидер до моментот пред да се додадат во пуферот за ПВР. После додавањето, Так ДНК полимеразата се враќа на -20^{0}Ц, а примерокот од ДНК на +4^{0}Ц. Вака припремениот пуфер се меша внимателно и се центрифугира на 6400 ввм 5 секунди.

Се обележува пластичниот носач. Во секое од ведренцата внимателно се распоредува по 10 мкЛ од претходно припремениот пуфер за ПВР. При распоредувањето на пуферот треба да се внимава да не се допре дното на бунарчето каде што се наоѓаат лиофилизираните започнувачи (најдобро е пуферот да се лизга по ѕидот на бунарчето). Откако ќе се наполнат сите бунарчиња, пластичниот носач се затвора со затворач и се става во топлотен циклер (Слика 6.4).

Топлотното циклирање се врши според долната шема:

Чекор 1	иницијална денатурација на 94^{0}Ц во времетраење од 2 минути;
Чекор 2 (10 циклуса)	денатурација 94°Ц-10 секунди анилинг+екстензија 65^{0}Ц-60 секунди
Чекор 3 (20 циклуси)	денатурација 94°Ц-10 секунди анилинг 65^{0}Ц-50 секунди екстензија 72^{0}Ц-30 секунди
Чување	дефинирано време на 4^{0}Ц

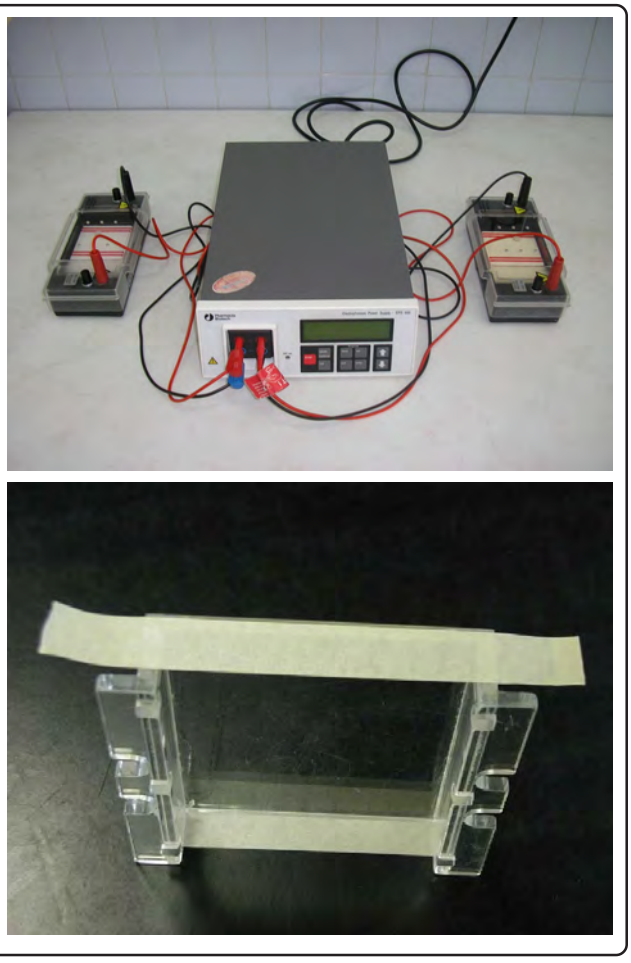


Слика 6.4: Внесување раствори за ССП методот во носач од 96 ведренца и сместување на примероците во топлотен циклер (сајклер).

6.3.2. Агарозна гел електрофореза

6.3.2.1. Потребен материјал

6.3.2.1.1. Мини електрофореза (Слика 6.5)



Слика 6.5: Апарат за минигел електрофореза со две кадички.

- Апарата за мини електрофореза (исправувач на струја, мали кадички, чешли).

6.3.2.1.2. Макро електрофореза (Слика 6.6)

- Апарата за макро електрофореза (исправувач на струја, големи кадички, чешли).

6.3.2.1.3. Осветлување и фотографирање

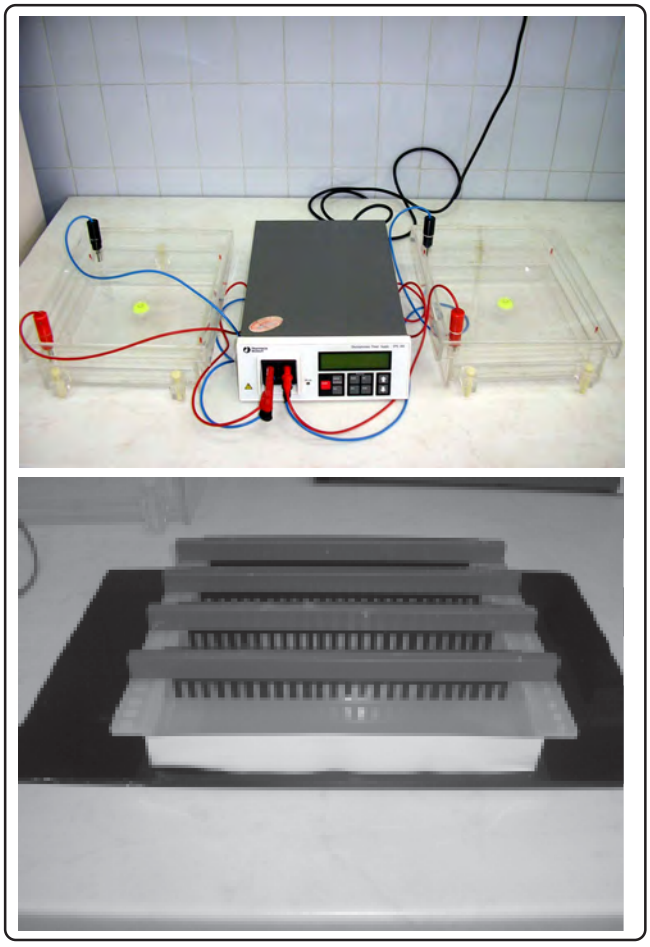
- Ултравиолотен осветлувач
- Мала комора.
- Голема комора.
- Полароид камера.
- Црно бели полароид филмови.

6.3.2.1.4. Хемикалии

- Примерок на ДНК (или амплификони).
- ДНК скала (ладер). Смеша од ДНК фрагменти (обично 10-20) со позната големина. Големината на ДНК фрагментите кои се раздвојуваат со помош на електрофорезата се одредува преку споредба на нивната релативна позиција со позицијата на траките добиени од ДНК скалата (ладерот).
- Пуфер (1x TAE со pH=8.5).
- Агароза.
- Етидиум бромид.
- Обоен обележувач кој содржи нискомолекуларна боја, како на пр. бромфенол сино (за да ни овозможи следење на процесот на електрофореза) и глицерол (за да ја зголеми густината на примерокот на ДНК, со што би се овозможило негово задржување на местото на внесување).

6.3.2.1.5. Стакларија и друго

- Ерленмаерка од 500 мЛ.



Слика 6.6: Апарат за макрогел електрофореза со две кадички.

- Мензура од 500 мЛ.
- Чаши од 1 литар.
- Колби од 1 литар.
- Латекс ракавици за еднократна употреба.
- Микропипети.
- Пластични продолжетоци.

6.3.2.2. Агарозна гел електрофореза

6.3.2.2.1. Припрема на TAE пуфер

Припрема на 50 x TAE (pH=8.5):

Се мерат 242.28 гр ТРИС (hidroxymethyl-aminoethan) и се префрлаат во стаклена чаша од 1 литар. Во чашата се додаваат 500 мЛ дестилирана вода, 57.5 мЛ глацијална CH_3COOH и 18.612 гр ЕДТА. По подесување на pH се дополнува до еден литар)

Припрема на 1x TAE:

Ве стаклена мензура се мерат 40 мЛ 50 x TAE и се префрлаат во стаклена колба од 2 литри. Се дополнува до 2 литри со дестилирана вода.

6.3.2.2.1. Припрема на 2% гел за електрофореза

Припрема на носачот на гел (Слика 6.5)

Се зема носачот на гел и од двете страни се затвора со самолеплива лента. Потоа, на однапред означени места се стават 4 чешли.

Припрема на гелот (Слика 6.7)

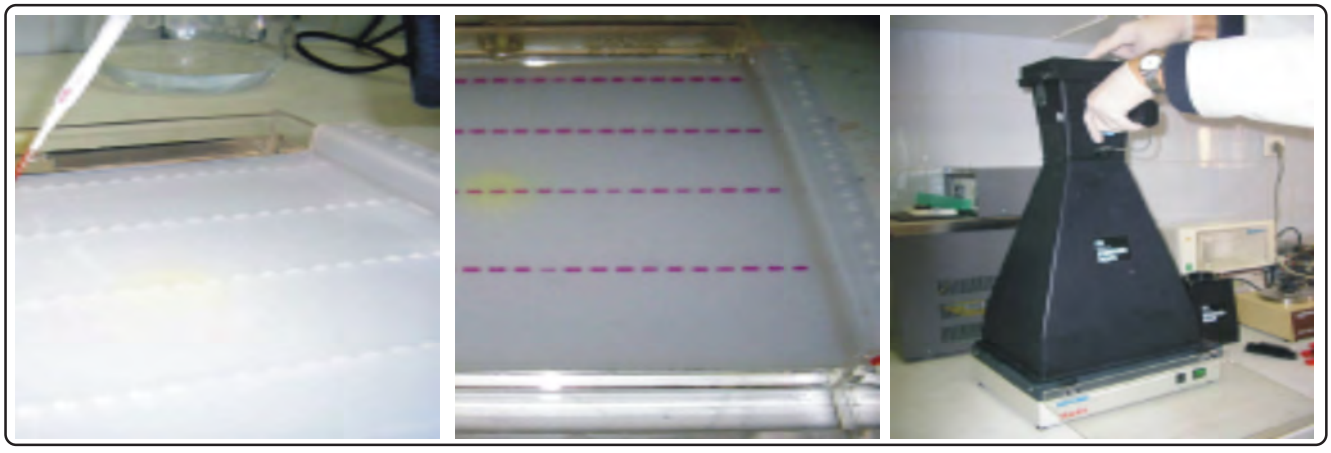
- Се мерат 5.5 гр агароза и се префрлаат во Ерленмаерка од 500 мЛ. Во Ерленмаерката се додава 275 мЛ 1x TAE.
- Ерленмаерката се загрева се додека гелот не се избистри (не почне да врие).
- Гелот се лади до приближно 60^0Ц со постојано мешање.
- Се додава 30 мкЛ етидиум бромид (од оваа стапка неопходно е постојано носење на ракавици за еднократна употреба) и се промешува.
- Оладениот (до приближно 60^0Ц) гел се истура во претходно припремениот носач на гелови.
- Откога гелот потполно ќе се олади и ќе се стврдне, се отстрануваат чешлите.

Гел електрофореза (Слика 6.8)

- Непосредно пред да заврши циклирањето, се вади самолепливата лента и носачот заедно со гелот се префрла во апаратот за електрофореза, за да се овозможи стабилизирање на системот. Пуферот треба комплетно да го прекрива гелот. Дупчињата каде што треба да се аплицираат примероците, треба да се поблиску до негативната електрода.
- По 9 мкЛ од секое бунарче се префрла во соодветно бунарче на гелот. Во едно бунарче се аплицира ДНК скала (ладер).
- Откога ќе се аплицираат сите примероци во гелот, се затвора апаратот за електрофореза и се пушта



Слика 6.7: Приготвување гел за електрофореза во голема када.



Слика 6.8: Гел електрофореза и фотографирање на макрогел електрофорезата со поларoид камера.

електрофорезата (25 мин; 130V; 250mA, 46W). Бојата која се наоѓа во ДНК скалата и во примероците патува побрзо од нив и се однесува како *прв бран*. Кога *првиот бран* ќе дојде до крајот на гелот, се исклучува струјата.

Фотографирање на гел електрофорезата (Слика 6.8)

- По завршената електрофореза, гелот во кој има етидиум бромид се осветлува на ултравиолетно светло и се фотографира со полароид камера.
- Резултатите од фотографијата се сечат и се лепат (Слика 6.9).

6.4. Задача

Да се изведе ССП методот според протоколот опишан во точката 6.3.1. Примероците од бунарчињата да се пуштат на електрофореза и да се фотографира гелот. Да се залепи сликата од гелот на предвиденото место (Слика 6.9). Да се напише во кои бунарчиња постои специфична амплификација.

Слика 6.9: Формулар за лепење фотографија од гел електрофореза на ССП.

Специфични амплификати има во бунарчињата со реден број: _____

Дата	Студент	Асистент
_____	_____	_____

БЛОК 3

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 7.МЕТОД НА РЕВЕРЗНА ХИБРИДИЗАЦИЈА (REVERSE LINE STRIP - RLS)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- што е и кога се изведува реверзна хибридизација;
- да протолкуваат мутации за хемохроматоза.

ВЕЖБА 8. ИСПИТУВАЊЕ ГЕНСКО ПРИКАЖУВАЊЕ СО ВЕСТЕРНОВИ ДАМКИ

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- како се изведува методот на генско прикажување со Вестернови дамки;
- да анализираат промени во експресијата на различните регулатори на клеточниот циклус по стимулација со имуностимулаторни ДНК секвенци;
- да анализираат промени во експресијата на поли (АДП рибоза) полимеразата (PARP) кај клеточната линија Јуркат (JPX-9) по инкубација со цинк, односно кадмиум.

ВЕЖБА 9. ПРИКАЖУВАЊЕ ТУМОРСКИ МОЛЕКУЛИ - ПРОСТАТЕН СПЕЦИФИЧЕН ПРОТИВГЕН (ПСА)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- за местото и улогата на простатниот специфичен протеин како туморска молекула;
- да определат концентрација и да протолкуваат резултат од ПСА.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	0.50 поени
ЗНАЕЊЕ	2.50 поени
ВКУПНО:	3.00 поени

ВЕЖБА 7: МЕТОД НА РЕВЕРЗНА ХИБРИДИЗАЦИЈА (REVERSE LINE STRIP - RLS)

7.1. Вовед

Хибридизациските методи претставуваат стандардни техники во молекуларната биологија. Вообичаено, тие се користат за откривање на одредени целни секвенци во комплексен раствор од ДНК и РНК молекули. Молекулите на ДНК или РНК се пренесуваат и имобилизираат на нитроцелулозни или почесто на најлонски мембрани. Комплементарните едноверижни проби се обележуваат радиоактивно или нерадиоактивно. Кога се хибридизираат на филтерот, пробите се поврзуваат со комплементарната целна секвенца преку водородни врски. Нехибридизираните проби се измиваат, а специфично врзаните проби се откриваат со авторадиографија или со специфично боење.

Водородните врски продуцираат стабилни но, реверзибилни поврзувања на двоверижната ДНК. За репликација или транскрипција *ин виво*, важно е дека двете ДНК нишки може да се одделат и повторно да се поврзат во физиолошки услови, без да се раскинат ковалентните врски. Тоа претставува основа на *ин витро* техниките за хибиридизација. Терминот хибридизација се однесува на поврзувањето на комплементарните едноверижни ДНК или РНК молекули за да се добие хибридна двоверижна молекула.

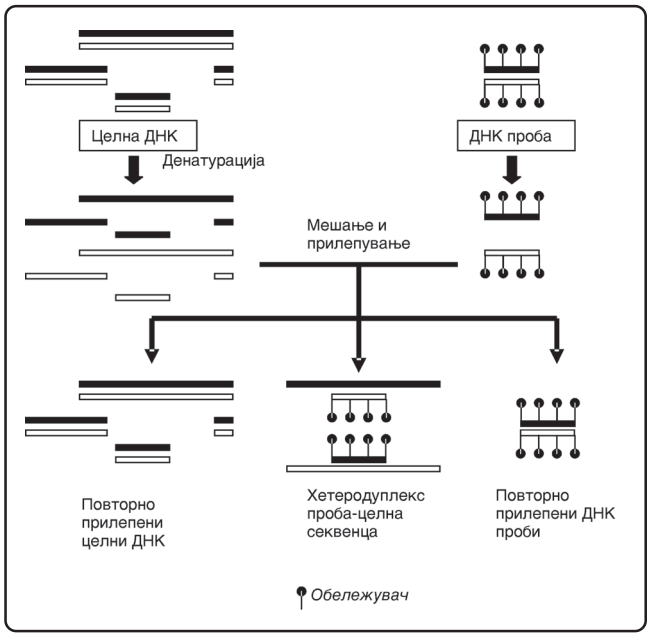
Хибридизацијата може да настане:

- Во раствор, каде молекулите на нуклеинските киселини се присутни како едноверижни нишки;
- Со една целна нишка (таргет) имобилизирана на филтер мембрана, а другата нишка (проба) е во растворот;
- *Ин ситу*, каде целната нишка (таргет) е фиксирана на ткивни пресеци, клетки или хромозоми, а пробата е присутна во растворот.

На молекуларно ниво, хибридизацијата започнува кога краевите од двете комплементарни молекули ќе дојдат во близина. Кога ќе настане спарување на едниот крај, тоа продолжува како затворање на патент по должината на молекулата. Комплексноста, односно различието на секвенците ја ограничува брзината на овој процес. Колку има повеќе повторувачки (репетитивни) секвенци, односно помала комплексност, хибридизацијата е побрза.

7.2. Дефиниција на молекулската хибридизација

Молекулската хибридизација подразбира мешање на единечни нишки на нуклеински киселини од два различни извори: обележана нуклеинска проба и необележана целна ДНК. Двете нишки од двоверижната ДНК проба треба претходно да се раздвојат (DNK denaturation или melting). Доколку целната ДНК е исто така двоверижна, таа треба да се денатурира, најчесто со топлина или со алкалии за да се раздвојат двоверижните нишки. По мешањето на единечните нишки од ДНК пробата и целната ДНК, ДНК нишките ќе почнат да се поврзуваат врз основа на комплементарноста на базните секвенци (DNK renaturation или annealing). Комплементарните ДНК проби ќе се поврзат и ќе формираат ***хомодуплекси,*** исто како и комеплементарните целни ДНК нишки. Корисноста на хибридизацискатa метода е што ДНК пробата ќе се поврзе и со комплементарната целна ДНК и ќе формира ***хетеродуплекси.*** Најчесто пробата содржи мала специфична секвенца, додека целната ДНК е хетерогена смеша од различни секвенци. Основниот принцип



Слика 7.1: Метод на ДНК хибридизација и формирање на хетеродуплекси помеѓу обележените едноверижни ДНК проби и комплементарната целна ДНК секвенца.

на методот, според тоа, е да се користи проба за да се идентификува било кој ДНК фрагмент во комплексната целна ДНК кој може да биде поврзан со секвенцата на ДНК пробата (Слика 7.1).

7.3. Фактори кои влијаат врз хибридизација на нуклеинските киселини

Факторите кои влијаат врз стабилноста на хибридите на ДНК и РНК молекулите се прикажани во Табела 7.1. *Должината на хибридите, содржината на G-C нуклеотидите и бројот на несоодветни спарувања (mismatches)* зависи од примарната структура на хибридните молекули. Подолгите хибридни молекули имаат повисока вкупна врзна енергија и поголема стабилност. Бидејќи има три водородни врски помеѓу секој пар на GC нуклеотидите, а две помеѓу AT нуклеотидите (AU кај РНК), хибридите кои имаат повеќе GC парови се постабилни отколку AT-хибридите. Доколку двете нишки не се потполно комплементарни, со хибридизацијата се добиваат несоодветни спарувања (mismatches). Вкупната врзна енергија на хибридите со несоодветни спарувања е намалена, а тие се помалку стабилни.

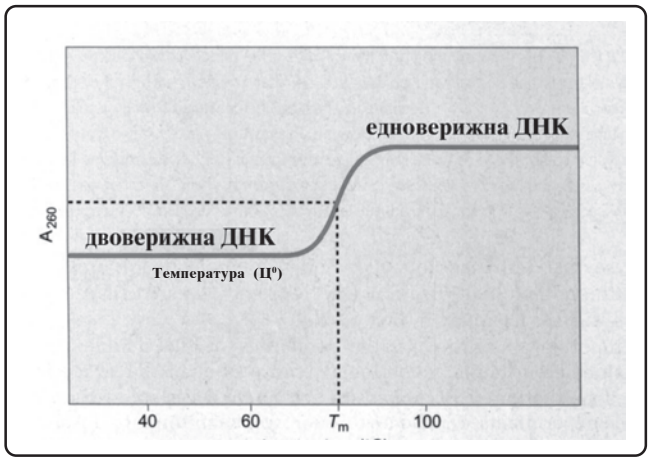
Условите на растворите кои влијаат врз хибридизацијата се *температурата, концентрацијата на солите, pH и концентрацијата на денатурирачките раствори.* Со модификација на условите може да се постигне соодветно ниво на **стрингентност,** т.е. специфичност на хибридизацијата. При ниски стрингентни услови, доаѓа до непрецизно спарување, додека при високи стрингентни услови се обезбедува хибридизација само на комплементарните нишки. Високата темература и ниската концентрација на соли (NaCl) обезбедуваат висока стрингентност.

Табела 7.1: Фактори кои влијаат на стабилноста на хибридните ДНК молекули.

	Зголемена хибридна стабилност	Намалена хибридна стабилност
Молекулски карактеристики		
Должина на хибридот	Долг	Краток
Содржина на G-C	Висока	Ниска
Број на несоодветни спарувања (mismatches)	Мал	Голем
Услови на растворите		
Темература	Ниска	Висока
Концентрација на соли (NaCl)	Висока	Ниска
pH	Ниска	Висока
Концентрација на денатурантни раствори	Ниска	Висока

7.4. Денатурација и точка на расплетување (melting point)

Корисна мерка за стабилноста на дуплексите е ***мелтинг температурата (Тм).*** Тоа е температура која одговара на средната точка на преодот од двоверижна кон едноверижна форма. Практично, овој преод може да се следи со мерење на оптичката густина на ДНК. Базите на нуклеинските киселини апсорбираат 260 нм ултравиолетова светлина. Сепак, апсорпцијата на двоверижната ДНК е помала од таа на слободните нуклеотиди. Оваа разлика, таканаречена ***хипохромен ефект***, е резултат од интеракцијата помеѓу електронските системи на соседните бази, се појавува кога соседните бази се наредени во паралелни двојни спирали (хеликси). Доколку двојната ДНК е изложена на топлина, тогаш ќе има зголемување на апсорпцијата на светлина на 260 нм (***оптичка густина$_{260}$ или ОГ$_{260}$***) стремејќи се кон карактеристиките на слободните



Слика 7.2: Крива на ДНК денатурација.

бази. *Температурата на која се наоѓа средната точка на преодот на оптичката густина се означува како* ***Тм*** (Слика 7.2). За геномите на цицачите, со базна композиција од околу 40% GC, ДНК се денатурира со **Тм** од приблизно 87°Ц во физиолошки услови. **Тм** на потполно комплементарните хибриди создадени од ДНК, РНК или олигонуклеотидните проби може да се одреди според следните формули на Табела 7.2.

Табела 7.2: Равенки за калкулирање на Тм.

[а] *За било кој моноваленten катјон, но прецизен само во опсег 0.01-0.4M.*

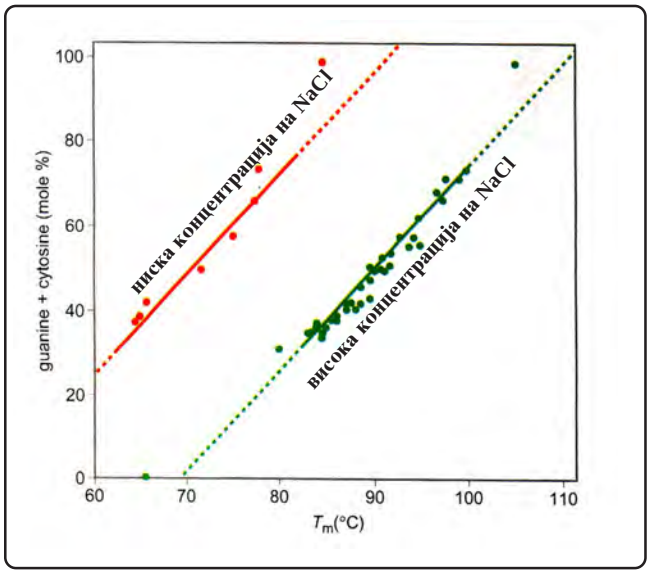
[б] *Точно само за %GC од 30 до 75%.*

[в] *Л = должина на дуплекси во базни парови.*

[г] *Олиго=олигонуклеотид; точно само за должини до 20 нуклеотиди (ниска GC содржина) или до 40 нуклеотиди (доколку GC е висока).*

Хибриди	Тм (°Ц)
ДНК-ДНК	$81.5 + 16.6(\log_{10}(Na^+)^a) + 0.41(\%GC^б) - 500/Л^в$
ДНК-РНК или РНК-РНК	$79.8 + 18.5(\log_{10}(Na^+)^a) + 0.58(\%GC^б) + 11.8(\%GC^б)^2 - 820/Л^в$
Олиго-ДНК или олиго-РНК[г]	2 x број на АТ бп + 4 x број на GC бп

Се одбираат хибридизациски услови за да се обезбеди создавање хетеродуплекси, а хибридизациската температура е често 25°Ц под **Тм**. Сепак, по хибридизацијата и отстранување вишокот на проби, измивањето треба да се спроведе под уште пострингентни услови, за да се раскинат сите дуплекси освен оние кои имаат многу блиски секвенци. Хетеродуплексите од пробата и целната ДНК се термодинамички најстабилни кога регионот за формирање на дуплексите содржи потполно комплетно базно спарување. Непотполното спарување помеѓу двете нишки на хетеродуплексот ја намалува **Тм**: за нормални ДНК проби, секое 1% погрешно спарување ја намалува **Тм** за приближно 1°Ц. Покрај тоа што хетеродуплексите од пробата и целната ДНК не се стабилни како хомодуплексите, постои одреден степен на толерирање на погрешното спарување доколку вкупниот регион на базната комплементарност е долг (> 100 бп). Со зголемување концентрацијата на NaCl и смалување на температурата се смалува хибридизациската стрингентност и се обезбедува стабилност на погрешно спарените хетеродуплекси (Слика 7.3). Тоа значи дека различни членови од мултигена фамилија или друга повторувачка (репетитивна) ДНК фамилија може да се идентификуваат со хибридизација доколку се користи специфичен член од фамилијата како проба. Покрај тоа, генската секвенца од еден вид може да се користи како проба за да се идентификуваат хомолози во други компаративни видови, што е значајно во текот на еволуцијата заради конзервирање, т.е. зачувување на таа секвенца низ еволуцијата.



Слика 7.3: Зависност на ДНК денатурација од содржината на G + C и концентрацијата на соли (NaCl).

Може да се одберат услови за да се постигне максимална хибридизациска стрингентност (пр. со смалување на концентрацијата на NaCl и зголемување на температурата) за да се обезбеди денатурација на

погрешно спарените хетеродуплекси. Доколку регионот на базна комплементарност е мал, како кај олигонуклеотидните проби (околу 15-20 нуклеотиди), може да се одберат хибридизациски услови кои ќе обезбедат нестабилност на хетеродуплексите доколку постои единечно погрешно базно спарување.

За хибридизацијата на филтер, сепак кинетиката на формирањето на хибридите и **Тм** на хибридните молекули се различни од оние при хибридизација во раствори. Заради тоа, времето на хибридизација и стрингентноста за хибридизацијата на филтер треба емпириски да се одреди.

7.5. Кинетиката на повторно поврзување на ДНК нишките се дефинира како продукт од концентрацијата на ДНК и времето ($C_o t$)

Кинетиката на повторното поврзување ја опишува брзината со која едноверижната секвенца може да ја пронајде комплементарната секвенца и да се поврзе со неа. Тоа е детерминирано од два главни параметри: почетната концентрација на специфичната ДНК секвенца (C_o) во моли на нуклеотиди на литар и реакционото време (t) во секунди. Тоа се означува како ***cot*** вредност. Бидејќи оваа вредност исто така зависи од температурата на повторно поврзување и концентрацијата на моновалентните катјони, се користат фиксни референтни вредности: температура на повторно поврзување од 65°Ц и концентрација на Na^+ од 0.3 M NaCl.

Врз основа на ова анализа, хуманиот геном се состои од три опсежни компоненти на секвенци:

1. Единечна копија на ДНК или многу мал број на копии (60%) - кои реасоцираат многу бавно.

2. Средно повторувачка (30%). Брзината на реасоцијација има средна вредност.

3. Високо повторувачка (10%). Реасоцира многу брзо.

Во комплексните геноми каков што е хуманиот геном, индивидуалните ДНК секвенци кои се јавуваат во единечна копија во геномот може да сочинуваат мала фракција од ДНК. Брзината на поврзување на ваквата единечна копија на ДНК во хумаката геномска ДНК е мала. Од друга страна, одредени секвенци често се повторуваат во хуманиот геном, така што времето за повторно поврзување е брзо. Бидејќи количината на целната ДНК која е врзана за пробата зависи од бројот на копии на препознаената секвенца, интензитетот на хибридизацискиот сигнал е пропорцинален со бројот на копии од препознатата секвенца: единечни копии даваат послаб хибридизациски сигнал, за разлика од ДНК секвенците кои често се повторуваат. Доколку одредена проба е хетерогена и содржи мал број копии на секвенцата од интерес, како што е некој специфичен ген, кога ќе се помеша со голема количина на повторувачка ДНК, слабиот хибридизациски сигнал во првиот случај може да биде замаскиран од силниот сигнал на повторувачката ДНК. Овој ефект може да се надмине со помош на *компетитивната хибридизација*.

Компетитивната или супресорна хибридизација вклучува блокирање на потенцијално силниот хибридизациски сигнал од повторувачката ДНК кој може да се добие кога се користи комплексна ДНК проба. Обележената ДНК проба се денатурира и се овозможува повторно да се поврзе во присуство на необележена тотална геномска ДНК во раствор или подобро во фракција која е богата со високо повторувачки ДНК секвенци. Во тој случај, високо повторувачката ДНК во необележаната ДНК е присутна во поголема количина отколку повторувачките елементи во обележената проба. Како резултат на тоа, таквите секвенци ќе се поврзат со комплементарните нишки на повторувачките секвенци во обележената проба, на тој начин блокирајќи ја нивната хибридизација за целната секвенца.

7.6. Нуклеински проби

ДНК или РНК проби се било кој дел од ДНК или РНК кој може да се обележи на некој начин и да се користи во хибридизациските техники, за да се идентифицира друга ДНК или РНК секвенца која е слична со нив во базните секвенци. Пробите може да се направат како едноверижни или двоверижни молекули, но работната проба мора да биде во форма на едноверижна нишка.

1. Конвенционални ДНК проби - се изолирани со клеточно ДНК клонирање или ДНК клонирање со ПВР.

2. РНК проби - се создаваат од ДНК која е клонирана во специјален плазмиден вектор.

3. Олигонуклеотидни проби - се кратки (15-30 нуклеотиди) едноверижни делови од ДНК добиени со хемиска синтеза: мононуклеотидите се додаваат еден по друг на почетниот мононуклеотид, вообичаено на 3' крајот кој е врзан за солидна основа. Обично олигонуклеотидните проби се дизајнираат со специфична секвенца која е одбрана врз основа на претходна информација за целната ДНК. Понекогаш, се користат *дегенерирани* олигонуклеотидни проби. Тоа значи паралелна синтеза на сет од олигонуклеотиди кои се идентични за одредени нуклоетидни позиции, но различни за други позиции.

7.7. ДНК дамчеста (блот) хибридизација

Постојат два начини за ДНК дамчеста (блот) хибридизација:

- Директно нанесување на ДНК или РНК раствори на нитроцелулозни или најлонски филтер мембрани (дот или слот блот);
- Трансфер на ДНК или РНК на филтер мембрани по нивното фракционирање по големина на агарозна гел електрофореза (Southern или Northern blot). ДНК пред електрофорезата се дигестира со рестриктивни ензими.

7.8. РНК дамчеста (блот) хибридизација

РНК дамчестата (блот) хибридизација е техника која вклучува детекција на специфични целни секвенци од тоталната РНК или мРНК кои се имобилизирани на филтер мембрана.

7.9. Методи и апликации на молекулската хибридизација

1. Дот блот и слот блот хибридизацијата се практични методи за идентификација на секвенци од нуклеинските киселини кај нефракциониран примерок од нуклеинска киселина. Во оваа процедура, раствор од целната ДНК, на пример, целата хумана геномската ДНК се нанесува на нитроцелулозна или најлонска мембрана и се суши (дот-блот) или се нанесува на индивидуален жлеб (слот-блот). Целните ДНК секвенци се денатурираат со топлина или алкалии и се изложуваат на раствор кој содржи едноверижни одбележени проби. По формирањето на хетеродуплекс формација меѓу пробата и целната секвенца, растворот со пробата се декантира, мембраната се мие, суши и чита со авторадиографија.

2. Алел специфична олигонуклеотидна (ACO) хибридизација е метод со кој може да се дискриминираат алели кои се разликуваат со единечна нуклеотидна супституција. Се користат ACO проби кои се обично со должина од 15-20 нуклеотиди, кои се воведуваат под хибридизациски услови во кои ДНК дуплексот меѓу пробата и целната секвенца е стабилен само доколку постои потполно прецизна базна комплементарност помеѓу нив. Единечно погрешно спарување помеѓу пробата и целната секвенца го прави хетеродуплексот нестабилен. Вообичаено, олигонуклеотидите се дизајнираат така што единечната нуклеотидна разлика помеѓу алелите се поставува во централниот сегмент од олигонуклеотидната секвенца.

3. Southern и Northern блот хибридизација се методи со кои се детектираат целните ДНК и РНК фрагменти кои се фракционирани според големина со гел електрофореза. Кај ***Southern blot*** технологијата целната ДНК се дигестира со еден или повеќе рестриктивни ензими, се фракционира на гел електрофореза, денатурира и пренесува на нитроцелулозна или најлонска мембрана за хибридизација. ***Northern blot*** хибридизацијата е варијанта на Southern blot, каде целната нуклеинска киселина е РНК наместо ДНК. Главната употреба на овој метод е да се добие информација за прикажувањето (експресијата) на специфични гени. Откако генот ќе се клонира, тој може да се користи како проба и да се хибридизира во Northern blot техника во различни ленти, примероци на РНК изолирани од различни ткива. Добиените податоци може да обезбедат информации за типовите на клетките каде што се прикажува генот.

4. Colony blot и **plaque lift хибридизација** се методи за скрининг на одделени бактериски колонии или плаки по инфекција на бактериите со бактериофаги.

5. *In situ* хибридизацијата вклучува хибридизација на нуклеинска проба со денатурирана ДНК од

хромозомски препарати или РНК во фиксирани ткивни пресеци. **Хромозомската ин ситу хибридизација** е едноставна процедура за мапирање на гени и други ДНК секвенци каде соодветна обележана ДНК проба се хибридизира со хромозомска ДНК која е денатурирана ин ситу. Кај **ткивната ин ситу хибридизација** обележаната проба се хибридизира со РНК од ткивните пресеци.

7.10. Метод на реверзна хибридизација

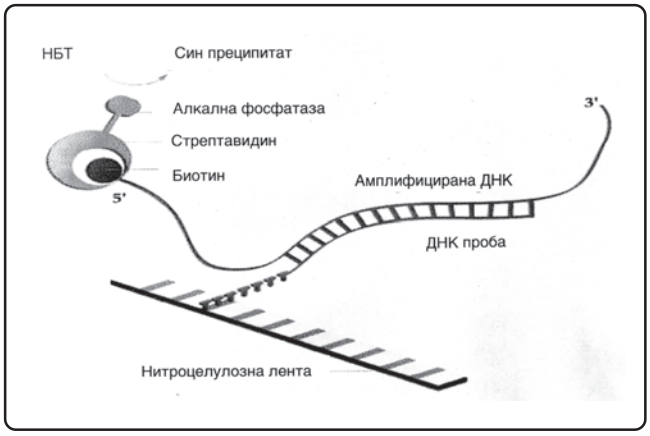
За изведување на вежбата се користи комерцијален кит од *ViennaLab за* Haemochromatosis Strip Assay B. Во него се наоѓа материјал за изолација на ДНК од полна крв, *ин витро* амплификација на егзоните 2 и 4 од ХФЕ генот и последователна детекција на три мутации со методот на реверзна хибридизација.

Во методот на реверзна хибридизација, обележаните ПВР продукти се хибридизираат во единечна реакција со секвенцно специфични олигонуклеотидни проби линеарно имобилизирани на најлонска мембрана. Се користат нитроцелулозни ленти на кои комерцијално се нанесени олигонуклеотидни проби од едноверижна ДНК. Двоверижната ДНК од добиениот амплифициран продукт се денатурира со NaOH и се аплицира во кадичка каде се наоѓаат нитроцелулозните ленти за да се овозможи хибридизација со олигонуклеотидните проби, под посебни хибридизациски услови. ПВР продуктот се добива со биотинилирани прајмери. Присуството на биотинилираниот ПВР продукт врзан за специфичната проба се детектира со стрептавидин-horseradish пероксидаза (ХРП) и хромоген субстрат кој го обојува местото на позитивната проба (Слика 7.4).

7.10.1. Изведување на вежбата

7.10.1.1. Потребен материјал

- Раствор за лизирање;
- Мастер микс за амплификација;
- Пуфер за Taq полимераза;
- Taq ДНК полимераза (5Е/мкЛ);
- ДНАТ-раствор за денатурација кој содржи 1.6% NaOH;
- Кадичка за типизирање;
- Ленти за типизирање;



Слика 7.4: Прикачување едноверижна ДНК на нитроцелулозни ленти.

- Пуфер за хибридизација;
- Wash solution A;
- Раствор за конјугација - содржи стрептавидин-алкална фосфатаза;
- Wash Solution B - содржи 0.05% NaN_3;
- Боја содржи nitro blue tetrazolium (NBT) и 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP).

7.10.1.2. Опрема

- Микроцентригуфа со 3000-12000 вртежи/минута;
- Инкубатор (водена бања) за загревање од 56°Ц до 98°Ц;
- Термосајклер;
- Водена бања со мешалка за температура од 45°Ц;
- Вакум аспиратор;
- Мешалка.

7.10.1.3. Методологија

Haemochromatosis Strip Assay B се базира на методот на реверзна хибридизација и вклучува 3 последователни чекори: 1) ДНК изолација од полна крв земена со антикоагуланс (ЕДТА или цитрат); 2) ПВР амплификација на егзоните 2 и 4 од ХФЕ генот со биотинилирани прајмери единечна (мултиплекс) ПВР реакција; 3) Хибридизација на амплифицираниот продукт на тест ленти кои содржат алелспецифични олигонуклеотидни проби (нормален и мутантен тип) кои се имобилизирани на лентите како паралелни линии. Врзаните биотинилирани секвенци се детектираат со стрептавидин алкална фосфатаза и обоен субстрат.

Овој кит содржи реагенси за детекција на трите најчести мутации за ХФЕ (H63D, S65C, C282Y).

7.10.1.4. Протокол за одредување на трите мутации за хемохроматоза со методот на реверзна хибридизација

1. Изолација на ДНК

2. ПВР амплификација

• Подготви свеж раствор од Taq полимераза и пуфер за Taq полимераза (1:25, конечна концентрација 0.2 Е/мкЛ);

• Во тубичка подготви ПВР реакција за секој примерок:

Мастер микс за амплификација	15 мкЛ
Растворена Так ДНК полимераза	5 мкЛ
ДНК	5 мкЛ
Вкупен волумен:	25 мкЛ

Термален циклус на амплификација:

	Температура	Време
Иницијална денатурација	94 °Ц	2 мин
35 циклуси:		
Денатурација	94 °Ц	15 сек
Прилепување	58 °Ц	30 сек
Екстензија	72 °Ц	30 сек
Крајна екстензија	72 °Ц	3 мин

Амплифицираните продукти се чуваат на 2-8°Ц до употреба. За анализа на амплифицираните продукти се користи гел електрофореза на 3% агарозен гел. Должина на фрагментите: 287, 310 бп.

3. Реверзна хибридизација

❖ ***Хибридизација (на 45°Ц; водена бања со мешалка)***

Воденатa бања треба да се загрее на 45°Ц (± 0.5°Ц). Пуферот за хибридизација и Wash Solution A треба претходно да се загреат на 45°Ц. Треба да се внимава сите формирани преципитати да се растворат целосно. Лентите за хибридизација се земаат со пинцета (само со ракавици) и се обележуваат со молив.

- Пипетирај **10 мкЛ ДНАТ** во долниот агол на секоја бразда што се користи во кадичката за типизирање. (една бразда се користи за еден примерок).
- Додади **10 мкЛ амплифициран продукт** во соодветната капка од ДНАТ и промешај со пипета (бојата останува сина).
- Остави ги на собна темепература **5 мин**.
- Додади **1 мЛ раствор за хибридизација** во секоја бразда (претходно загреан на 45°Ц). Нежно промешај. Сината боја ќе исчезне.
- Стави ги **тест лентите** за типизација во одделните бразди така што пробите да бидат видливи и потопи ги целосно.
- Инкубирај **30 мин на 45°Ц** на мешалка во водена бања (со брзина 50 вртења/мин).
- На крајот од инкубацијата, отстрани го растворот за хибридизација со вакуум аспирација.

❖ ***Stringent Wash (на 45°Ц; водена бања со мешалка)***

- Додади **1 мЛ Wash Solution A** (претходно загреан на 45°Ц). Кратко исплакни го (10 сек). Отстрани ја течноста со вакум аспирација.
- Додади **1 мЛ Wash Solution A** (45°Ц).
- Инкубирај на **45°Ц за 15 мин** во бања со мешалка. Отстрани ја течноста со вакуум аспирација.
- Додади **1 мЛ Wash Solution A** (45°Ц);
- Инкубирај на **45°Ц за 15 мин** во бања со мешалка. Отстрани ја течноста со вакуум аспирација.

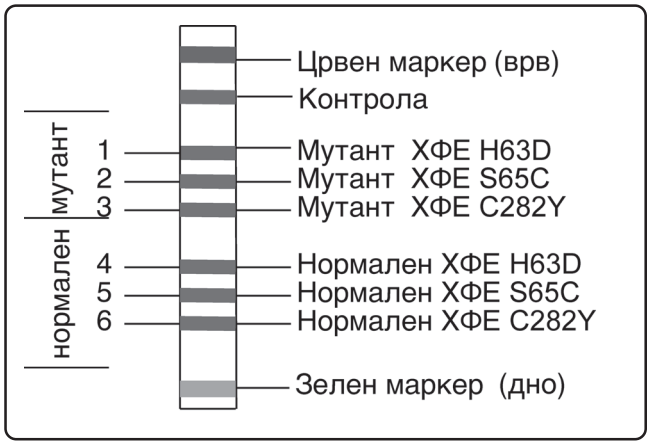
❖ ***Боење (на собна температура)***

- Додади **1 мЛ раствор за конјугација.**
- Инкубирај на **собна температура за 15 мин** на мешалка; Отстрани ја течноста со вакуум аспирација.
- Додади **1 мЛ Wash Solution B**. Кратко исплакни го (10 сек.). Отстрани ја течноста со вакуум аспирација.
- Додади **1 мЛ Wash Solution B**.
- Инкубирај на **собна температура за 5 мин** на мешалка. Отстрани ја течноста со вакуум аспирација.
- Инкубирај на **собна температура за 5 мин** на мешалка. Отстрани ја течноста со вакум аспирација.
- Додади **1 мЛ боја.**
- Инкубирај на **собна температура за 15 мин** на *темно* на мешалка; На местото на позитивната реакција ќе се појави розево обојување.
- Промиј ги лентите неколку пати со дестилирана вода. Остави ги да се сушат во темно на филтер хартија. Лентите не треба да се изложуваат на интензивна светлина по обојувањето.

7.10.1.5. Интерпретација на резултатите

Генотипот од примерокот се одредува со Collector листот кој се наоѓа во комплетот. Позитивната

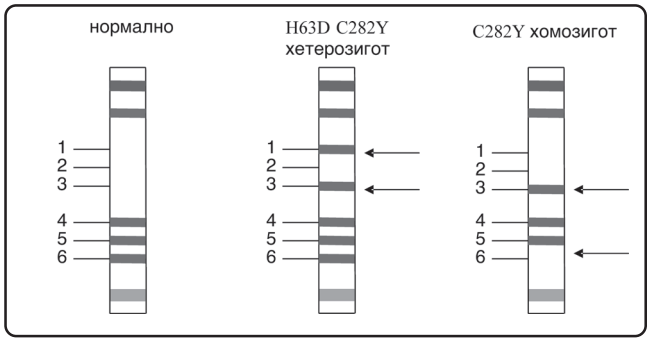
реакција на контролната лента покажува дека растворот за коњугација и бојата се соодветни. Оваа линија треба секогаш та биде позитивна (Слика 7.5).



Слика 7.5: Лента за нормален и мутантен тип на ХФЕ ген.

7.10.1.6. Резултати од тестот

За секоја полиморфна позиција, може да се добие обојување на пробите според една од следните комбинации (Слика 7.6):



Слика 7.6: Примери за нормален, хетерозиготен и хомозиготен генотип на ХФЕ генот.

1. Само на пробата од нормалниот тип: *нормален генотип*

2. На пробата од нормалниот и мутантниот тип: *хетерозиготен генотип (носител на мутантен ген)*

3. Само на мутантната проба: *хомозиготен мутантен генотип (заболен).*

7.11. Задача

Да се протолкува генотипот за ХФЕ генот за испитуваните примероци со методата на реверзна хибридизација според горенаведениот протокол.

Место за ленти (Слика 7.7):

Слика 7.7: Формулар за внесување резултат од реверзна хибридизација на генотипот од ХФЕ генот.

Интерпретација на резултатите:

Лента 1: _____

Лента 2: _____

Лента 3: _____

Лента 4: _____

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

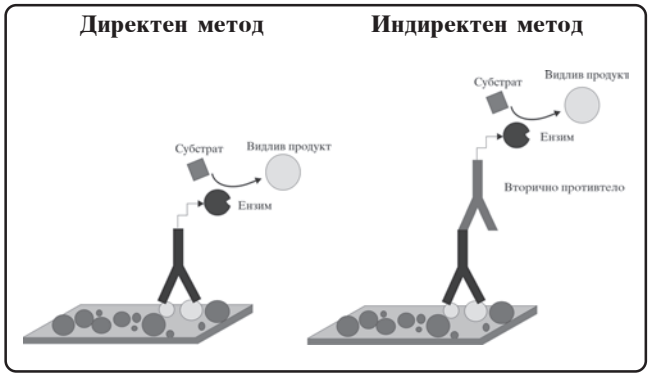
ВЕЖБА 8: ИСПИТУВАЊЕ ГЕНСКО ПРИКАЖУВАЊЕ СО ВЕСТЕРНОВИ ДАМКИ

8.1. Општо за Вестерновото дамкосување (blotting)

Поимот дамкосување (blotting) се однесува на трансфер на биолошки примероци од гел на мембрана и нивно последователно откривање на површината на мембраната. Вестерновото дамкосување(или имунодамкосување, бидејќи во основа на анализата лежи имунолошка противген-противтелна реакција) за првпат е претставен од Towbin и соработниците во 1979 година и од тогаш станува незаменлива рутинска алатка за квалитативна или семиквантитативна анализа на протеини. Специфичноста на реакцијата противген-противтело овозможува идентификување на одреден протеин во сложена смеша од протеини.

Вестерновото дамкосување се изведува во неколку стапки. Првата стапка е електрофоретско раздвојување на макромолекулите на некаков матрикс, најчесто полиакриламиден гел. Раздвоените молекули потоа се трансферират на нитроцелулозна или поливинилиден-флуоридна (ПВДФ) мембрана по што следат неколку инкубации на мембраната која ги содржи трансферираните протеини со различни раствори за на крај да може да биде детектиран специфичниот протеин.

Во зависност од тоа дали се употребува само едно противтело кое специфично го препознава бараниот



Слика 8.1: Директен и индиректен метод за Вестерново дамкосување. Кај директниот метод, обележеното примарно противтело се врзува за противгенот (протеинот) врз површината од мембраната, реагира со супстратот и создава сигнал кој може да се детектира. Кај индиректниот метод, необележеното примарно противтело се врзува за протеинот, а секундарно, обележено противтело се врзува за примарното создавајќи откривлив продукт.

Табела 8.1: Споредба на директниот и индиректниот метод на Вестерново дамкосување.

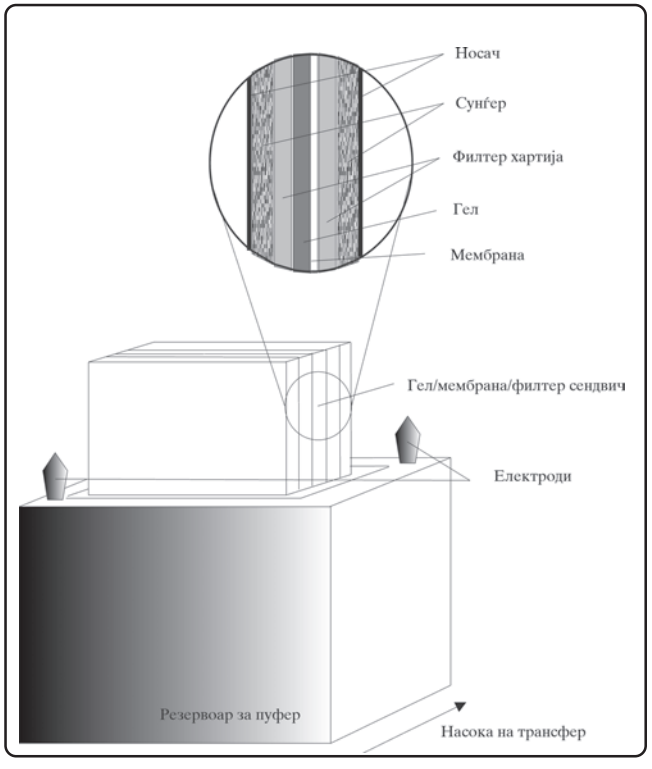
Директен метод	
Предности	• Брза постапка бидејќи се користи само едно противтело. • Евентуална вкрстена реактивност на второто противтело е елиминирана.
Негативни особини	• Имунореактивноста на првото противтело се намалува поради обележувањето. • Обележување на секое првично противтело е скапа постапка. • Нема можност за засилување на сигналот.
Индиректен метод	
Предности	• Сензитивноста е зголемена бидејќи секое првично противтело може да врзе неколку обележени вторични противтела. • Комерцијално се достапни повеќе различно обележени вторични противтела. • Имунореактивноста на првичното противтело не е засегната со обележувањето.
Негативни особини	• Вкрстена реактивност може да се појави за вторичното противтело што резултира во неспецифичен сигнал. • Потребна е дополнителна инкубациска стапка.

протеин или пак и второ, кое е специфично за првото, постојат 2 варијанти на Вестерновото дамкосување: директна и индиректна. Пошироко прифатено е индиректното Вестерново дамкосување (Слика 8.1).

Основните карактеристики и разлики меѓу директниот и индиректниот метод на Вестерновото дамкосување се сумирани во Табела 8.1.

8.2. Пренесување протеините на мембрана

По електрофоретското раздвојување протеините од гелот мора да се пренесат на мембрана. Најчесто користен метод за пренесување на протеините е електроелуцијата или елетрофоретски трансфер. Овој метод ја користи електрофоретската мобилност на протеините, а се одликува со одлична брзина и ефикасност. За негово изведување е потребно гелот кој ги содржи протеините да дојде во директен контакт со мембраната на која сакаме да ги пренесеме протеините и овој "сендвич" да се постави помеѓу 2 електроди потопени во соодветен раствор (Слика 8.2).



Слика 8.2: Електрофоретски трансфер на протеини од гел на мембрана.

Кога помеѓу електродите се воспостави електрично поле, протеините мигрираат од гелот кон мембраната при што го задржуваат својот распоред, па мембраната станува копија од протеинската слика на гелот.

Ефикасноста на трансферот зависи од комплетниот контакт на гелот и мембраната, големината и составот на протеините, јачината на електричното поле и присуството на детергенти. Откако трансферот се комплетира, а пред почнување на постапките за детектирање на протеините, препорачливо е да се провери ефикасноста на пренесу-вањето со обојување на протеините на мембраната, на пример со бојата Ponceau S.

8.3. Блокирање на неспецифичните врзувачки места

За да се намалат неспецифичните врзувања на мембраната со различните противтела при неопходните инкубации, неопходно е да се направи блокирање на нереактивните места. Блокирачките пуфери ја зголемуваат сензитивноста на тестот со намалување на заднинскиот сигнал. Изборот на блокирачки раствор за одредена дамка зависи од противгенот кој се открива, како и од типот на ензим со кој противтелото е конјугирано. Така на пример, ако се користи коњугат со алкална фосфатаза, блокирачкиот раствор се припрема во ТБС (раствор на пуфериран трис) бидејќи ПБС (раствор не пуфериран фосфат) интерферира со алкалната фосфатаза. Најчесто како блокирачки раствор се користат 5% раствор на обезмастено млеко или 5% прочистен говедски албумин во ТБС.

8.4. Плакнење

Како и во останатите имунолошки постапки базирани на реакцијата противген-противтело, Вестерновото дамкосување се состои од серија инкубации со различни имунохемиски реагенси, а меѓу нив стапки за плакнење. Плакнењата се неопходни за да се отстранат неврзаните реагенси и да се намали заднинскиот сигнал. Недоволно плакнење ќе овозможи силен заднински сигнал, а претерано плакнење може да ја смали осетливоста на тестот поради елуирање на

противтелото и/или противгенот од дамките. Ретко плакнењата се изведуваат во физиолошки пуфер како ТБС или ПБС без никакви додатоции. Почесто, детергент како 0.05% Tween, се додава во пуферот заради отстранување на неспецифично врзаниот материјал.

8.5. Првични и вторични противтела

Изборот на првичното противтело за Вестерновото дамкосување зависи од природата на противгенот што треба да се открие и од достапноста на противтела специфични за него. Комерцијално може да се набават огромен број на противтела, а лесно би можеле да се пребаруваат преку интернет страницата www.antibodyresource.com. Може да се користат и моноклонски (најчесто глувчешки)и поликлонски (најчесто зајачки) првични противтела, а колку специфичноста на противтелото и јачината на добиениот сигнал се поголеми толку противтелото е подобро за одредениот протеин.

Како вторични противтела за Вестерновото дамкосување можат да се користат различни обележени противтела, внимавајќи при тоа на видот на животно од кое потекнува првичното противтело. На пример, ако првичното противтело е моноклонско глувчешко, тогаш вторичното противтело мора да е противглувчешко противтело создадено и добиено во друг вид животно (зајак, коза, коњ). Како обележувачи на вторичните противтела се користат биотин, флуоресцеин, родамин, пероксидаза или алкална фосфатаза. Вообичаено, противтелата за Вестерновото дамкосување се купуваат како концентрирани (сток) раствори во концентрација од 1 мг/мЛ, а се користат како разредувања од 1/100 до 1/500.000. Како растворувач за противтелото се користи блокирачкиот раствор. Оптималното разредување за секој систем на откривање се одредува експериментално.

8.6. Потребно за изведување

8.6.1. Потребна апаратура

1. Апарат за СДС-ПАГЕ електрофореза;

2. Апарат за електроблотирање;

3. Хоризонтална мешалка;

4. Систем за сликање и развивање на рендгенски филмови.

8.6.2. Потребни реагенси

1. 10x PBS (пуфериран фосфатен раствор; 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na_2HPO_4 и 2.4 g KH_2PO_4 во 800 мЛ дестилирана вода. Се подесува pH до 7.4. Се додава вода до 1 литар.);

2. 10x TBS (пуфериран раствор на трис; за 1 литар се припрема 24.2 g Трис база, 80 g NaCl, се подесува pH до 7.6 со 1x HCl);

3. Раствор за перење TBS-T (1x TBS + 0.1% Tween 20);

4. Раствор за блокирање (TBS-T + 5% обезмастено млеко во прав);

5. Пуфер за трансфер на мембрана (25 mM Трис база, 0.2 M глицин, 20% метанол, pH 8.5);

6. Претходно обоен протеински обележувач за големина со широк опсег;

7. Колориметриски или хемилуминисцентен визуелизациски систем за Вестерново дамкосување (на пример ECL plus комплет од Amersham Biosciences).

8.7. Општ протокол за Вестерново дамкосување

8.7.1. Дамкосување на протеините

1. По завршеното СДС-ПАГЕ електрофоретско раздвојување на протеините се припрема сендвичот за трансферирање на протеините од гелот на ПВДФ мембрана;

2. Електротрансферот трае 60-80 минути, при I = 400 mA и U = 100 V.

8.7.2. Блокирање на мембраната и инкубации со противтела

1. По трансферот, мембраната се плакне во 25 мЛ

ТБС-Т 5 минути;

2. Инкубација со раствор за блокирање 1 час на собна температура;

3. Плакнење 3 пати со по 15 мЛ ТБС-Т, 5 минути секое;

4. Инкубирање на мембраната со првично противтело (во одговарачка дилуција) со нежно мешање, на 4°Ц преку ноќ;

5. Плакнење 3 пати со по 15 мЛ ТБС-Т, 5 минути секое;

6. Инкубирање на мембраната со вторично, обележено противтело со нежно мешање 1 час на собна температура;

7. Плакнење 3 пати со по 15 мЛ ТБС-Т, по 5 минути секое.

8.7.3. Откривање на протеините

1. Инкубација 5 минути на темно со луминогениот субстрат;

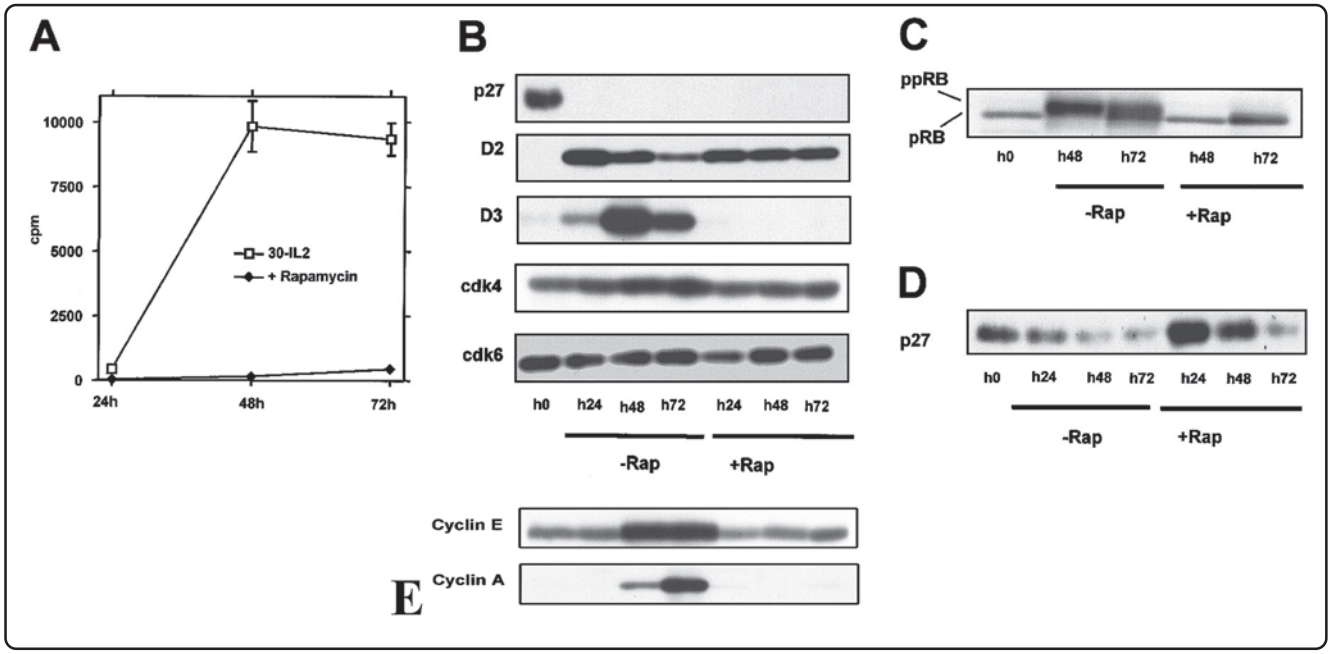
2. Се отстранува вишокот на луминоген (без исушување) со нежно допирање на мембраната до филтер хартија без притоа да се тријат површините. Мембраната се завиткува во најлонска фолија и се изложува на рендгенски филм. Се прави иницијалната експозиција од 10 секунди по што се проценува точното време за експозиција.

8.8. Задачи за студентот

8.8.1. Анализа на промените во експресијата на различните регулатори од клеточниот циклус по стимулација со имуностимулаторни ДНК секвенци

Анализирај ги промените во експресијата на различните регулатори на клеточниот циклус по стимулација со имуностимулаторни ДНК секвенци (Слика 8.3).

Прочистени Б лимфоцити од ХЛЛ се стимулирани 72 часа со ИСДС (А). За анализа на пролиферација, клетките се инкубирани со [^{3}H]-тимидин последните 8 часа од стимулацијата, по што е мерено вградувањето на [^{3}H]-тимидин на 24, 48 и 72 часа. Соодветните



Слика 8.3: Ефектот на рапамицин врз експресијата на протеините од клеточниот циклус.

клеточни лизати се пренесени на мембрана и анализирани со специфични моноклонски противтела за протеини важни во регулацијата на клеточниот циклус (B, C, D, E).

По анализа на резултатите од слика 8.3 одговорете на следниве прашања и внесете ги на Табелите 8.3 и 8.4:

Табела 8.3: Позитивни и негативни регулатори на клеточниот циклус.

Позитивни регулатори на клеточен циклус							
Негативни регулатори на клеточен циклус							

Табела 8.3: Ефект на имуностимулаторни ДНК секвенци и рапамицин врз регулаторите на клеточниот циклус.

Протеин	0 часа		24 часа		48 часа		72 часа	
	- Рап.	+ Рап.	- Рап.	+ Рап.	- Рап.	+ Рап.	- Рап.	+ Рап.
п27								
Д2								
Д3								
цдк4								
цдк6								
циклин Е								
циклин А								
ппРБ								

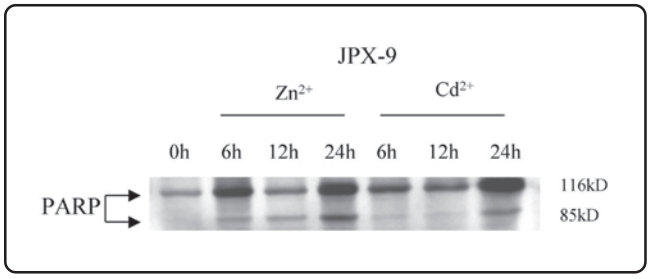
- Како дејствува рапамицинот врз фосфорилацијата на ретинобластниот протеин (pRB) (Слика 8.3Ц, Табела 8.3)?

- Имајќи во предвид дека кај испитуваните клетки по стимулација со имуностимулаторни ДНК секвенци има пролиферација во отсуство на рапамицин, кои од регулаторите на циклусот се позитивни, а кои негативни (Слика 8.3Б, Табела 8.2)?

- Како дејствуваат имуностимулаторните ДНК секвенци на циклин Е, а како на циклин А (Слика 8.3Е, Табела 8.3)?

8.8.2. Анализа на промените во експресијата на поли (АДП рибоза) полимеразата (PARP) кај клеточната линија Јуркат (JPX-9) по инкубација со цинк, односно кадмиум

Анализирај ги промените во експресијата на поли (АДП рибоза) полимеразата (ПАРП) кај клеточната линија Јуркат (JPX-9) по инкубација со цинк, односно кадмиум (Слика 8.4).



Слика 8.4: Кинење на ПАРП во клеточна линија JPX-9. ПАРП проензимот (116 kD) и откинатата подедеиница (85 kD) се прикажани со стрелки.

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

ВЕЖБА 9: ПРИКАЖУВАЊЕ ТУМОРСКИ МОЛЕКУЛИ - ПРОСТАТЕН СПЕЦИФИЧЕН ПРОТИВГЕН (ПСА)

9.1. Општо за малигните обележувачи (маркери)

Во високоразвиените земји малигните заболувања, по болестите на кардиоваскуларниот систем, се на второ место како причина за смртност на населението. Годишно околу 210.000-530.000 луѓе умираат од околу 150 различни видови на малигни заболувања. Секое трето лице во овие земји во текот на својот живот заболува од некое малигно заболување, додека кај секое четврто тоа заболување е причина за смрт. Инциденцата за појава на некое малигно заболување драстично се зголемува со возраста. Така, доколку инциденцата за појава на некое малигно заболување на 20 годишна возраст изнесува 1-2 на 1.000.000 жители, тогаш, на 80 годишна возраст изнесува 20 заболени на 1.000 жители. Треба да се нагласи дека кај различни популации постојат значајни разлики во типот на малигните зболувања.

Туморските обележувачи претставуваат материи кои се лачат директно од туморските клетки или од нетуморските клетки после нивна стимулација од страна на туморските клетки. Преку концентрацијата на туморските обележувачи во крвта и/или во другите телесни течности (хуморални телесни обележувачи), како и во/на самите клетки (клеточни туморски обележувачи), може да се суди за постоење на туморот или за прогнозата на малигното заболување. Во обележувачите кои се создаваат од страна на малигните клетки, спаѓаат: онкофетални противгени, јаглехидратни епитопи кои се препознаваат од страна на моноклонските противтела, ектопично создадени белковини, ектопично создададени хормони, диференцијацски и пролиферативни противгени, ензими, изоензими, продукти на онкогенезата и рецептори. Одредувањето на туморските обележувачи, како и на некои ензими во серумот, е доволно за поставување на дијагноза на постоење на тумор или за постоење на метастатското напредување.

Индикации за одредувањето на туморските обележувачи се:

- за рана детекција на малигни тумори кај високоризичните групи;
- за дијагноза;
- за прогностичка проценка;
- за проценка на успешноста на терапијата;
- рано откривање на повторна појава на туморот.

Најголема предност на имунолошките над останатите видови на тестови, кои се користеле за одредување на туморските противгени, е нивната голема сензитивност, со што е овозможено нивно откривање во наноrамски, а понекогаш дури и во пикограмски количини. За некои од овие туморски обележувачи е најдено дека се карактеристични за одредени видови на тумори, со што е овозможена нивна употреба во раното поставување на дијагнозата, како и во поставувањето на диференцијалната дијагноза. Меѓутоа, најголемиот дел од туморските обележувачи немаат голема специфичност која би ни овозможила поставување на дијагноза (поради лажно-позитивните резултати кои можат да се јават кај некои пациенти со немалигно заболување). Поради тоа, тие најчесто се употребуваат за следењето на терапијата и за проценка на нејзината успешност.

Секогаш треба да се има предвид дека секој пациент заболен од малигна болест има свои спостевни "базални вредности" за различни туморски обележувачи. Во најголем број на случаи, пред појавата на туморот, овие вредности не се познати. Ова ниво на туморските

обележувачи може да биде многу ниско, може да биде на горната граница на нормала, а во одредени случаи може да биде и над неа. Поради сето ова, со оглед на фактот дека не се знаат почетните "базални" вредности, кај некои пациенти после првата примена терапија, без разлика за каков вид на терапија се работи, нивото на обележувачите кое ќе се одреди во тој момент се зема како "референтна вредност" за нив и служи како "базална вредност" во понатамошната терапија. Во основа секогаш се поважни податоците за промена на вредноста на туморскиот обележувач кои континуирано се добиваат во текот на терапијата, одколку податокот добиен од единечно мерење, кој може да биде без никакво значење, иако е повисок од горната граница на нормалата.

9.2. Генетика на ракот на простата

Во настанокот и/или прогресијата на ракот на простата се вклучени одреден број различни гени. Некои од нив се: вродениот простатичен канцер-1 (hereditary prostate cancer-1, HPC1) на 1q; MAX-interacting протеин-1 (MXI1) на 10q и KAI1 простатичен противметастатски ген на 11p. Кај ракот на простатата се најдени точкасти мутации на MXI1 генот. Откриено е и постоење на предиспонирачки локус за рана појава на рак на простата на позицијата 1q42.2-q43, на извесна оддалеченост од HPC1 локусот. На Xq27-q28 (HPCX) и на 1p36 (CAPB) откриено е постоење на локуси кои ја зголемуваат осетливоста кон ракот на простатата. И на 17p постои ген (HPC2/ELAC2) кој е поврзан со појавата на рак на простатата. Кај болни со рак на простата се најдени соматски мутации во PTEN и MAD1L1 гените. Симболот PRCA1, според HUGO Nomenclature Committee, ја означува позицијата 1q24-q25, кај наследниот рак на простата. Губитокот на функцијата на KLF6 генот е асоциран со појавата на рак на простатата. И мутациите во генот за макрофагниот скавинџер рецептор-1 се поврзани со наследниот и ненаследниот рак на простатата. Мутациите во CHEK2 генот, кој е асоциран со не-p53-поврзаниот Li-Fraumeni синдром, се поврзани со наследниот и ненаследниот рак на простатата. Мутациската инактивација на EPHB2 генот влијае врз прогресијата и појавата на метастази кај ракот на простатата. На Табела 9.1 се дадени некои од болестите на простатата, гените кои се поврзани со нив, локацијата на гените и Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) класификацијата.

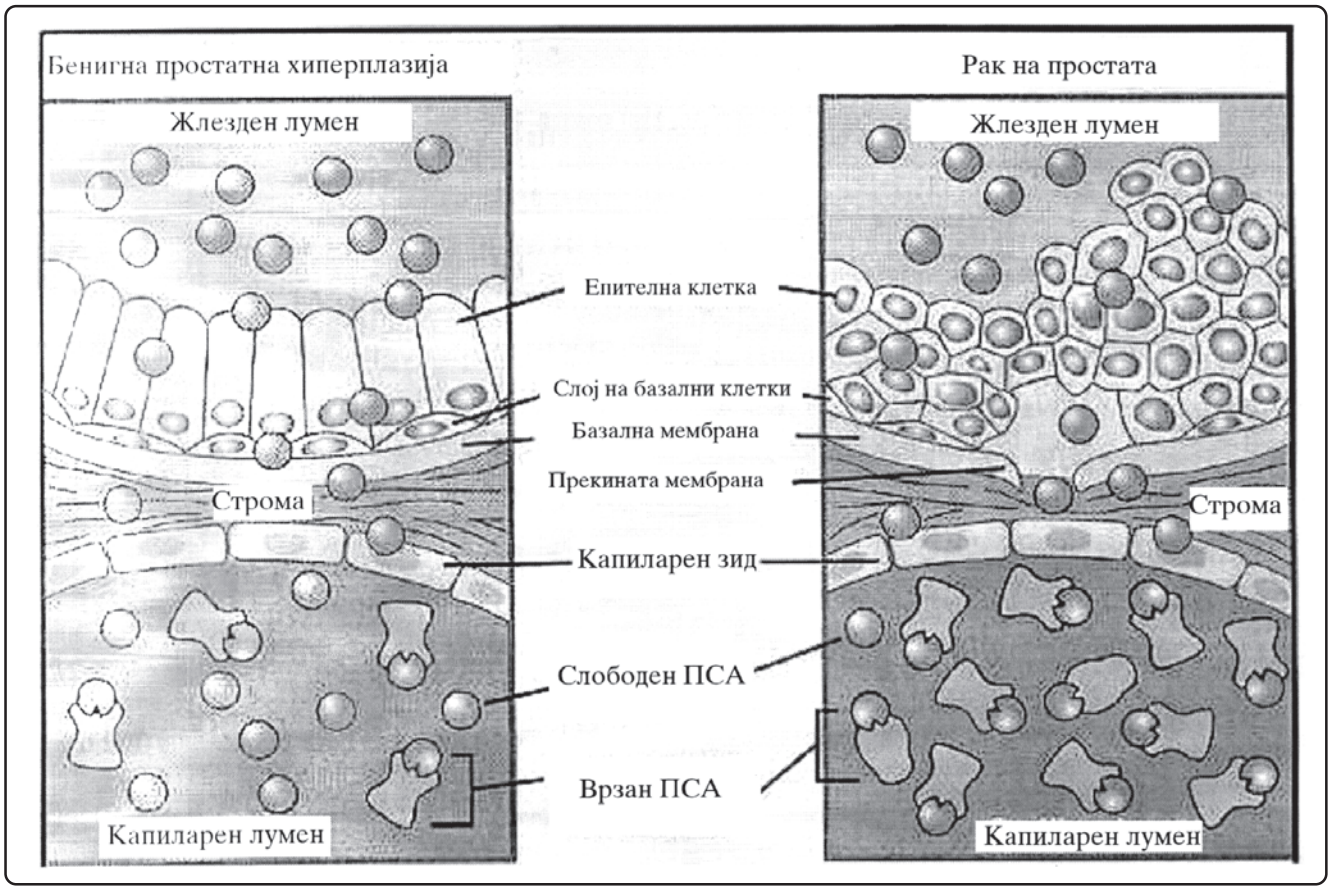
9.3. ПСА (prostate-specific antigen)

Во последно време ракот на простата станува се почест тумор кој се јавува кај мажите во понапреднатата возраст. Последните податоци покажуваат дека ракот на простата е најчестиот тип на тумор кај мажите и втор на листата како причина за смртност. Во моментот на поставувањето на дијагнозата, само 30% од случаите со карцином се ограничени на простата. Поради ова, со оглед на можностите кои ни се ставени на располагање за лекувањето на ова заболување, од голема важност претставува моментот на поставувањето на дијагнозата. Откритието на PSA претставува чекор напред во лекувањето на ова заболувње. PSA е орган-специфичен. PSA преставува туморски обележувач погоден за скрининг на населението за појава на карцином на простата. Заедно со мануелниот ректален преглед (ДРП), а по можност и со трансректалниот преглед со ултразвук, се изведува кај луѓе >50 години возраст, кои немаат никакви видливи симптоми за постоење на карцином на простата. Помеѓу концентрацијата на PSA во крвта и стадиумот на туморот постои позитивна корелација. Истовремено PSA може да служи и за следење на текот на болеста, како и за следење на успешноста на терапијата кај пациенти со примарен или метастатски карцином на простата.

PSA претставува едноверижен гликопротеин, составен од 240 аминокиселини, со молекулска маса од 33-34 kDa и активност на серинска протеаза. Претставува основна компонента на семиналната плазма и се синтетизира како од епителните клетки сместени долж ацинусите, така и од епителот од каналчињата на простатата. Оттаму се секретира во каналчињата на простата, каде концентрацијата му изнесува од 0.5-2 мкг/Л. Неговата функција во

Табела 9.1: Болести на простатата, гените кои се поврзани со нив, локацијата на гените и Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) класификација.

Болест	Ген(и)	OMIM	Локација
Простатен канцер 1, 176807, 601518 (3)	RNASEL, RNS4, PRCA1, HPC1	180435	1q25
Простатен канцер, 176807 (3)	BRCA2, FANCD1	600185	13q12.3
Простатен канцер, фамилијарен, 176807 (3)	CHEK2, RAD53, CHK2, CDS1	604373	22q12.1
Простатен канцер, наследен, 176807 (3) (?)	MSR1	153622	8p22
Простатен канцер, прогресија и метастази на, 176807 (3)	EPHB2, EPHT3, DRT, ERK	600997	1p36.1-p35
Простатен канцер, соматски, 176807 (3)	MAD1L1, TXBP181	602686	7p22



Слика 9.1: Создавање и лачење на ПСА во простатната течност.

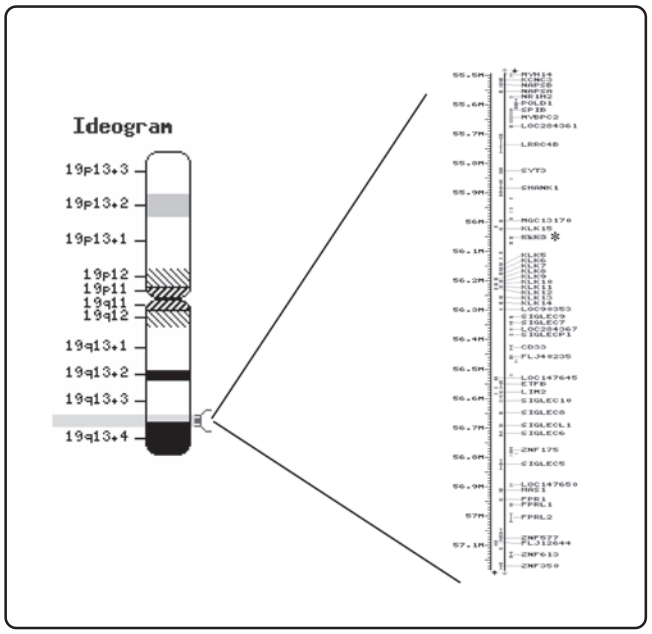
семената течност е да ги лизира семените коагулуми, поради што игра значајна улога во плодноста кај мажите. Концентрацијата на PSA во семената течност е за околу милион пати поголема од онаа во крвта. Во семената течност PSA претежно е во слободна форма. Бидејќи базалната мембрана која се наоѓа околу епителниот слој на клетките го спречува неговото продирање во крвта, PSA е присутен во серумот во мали концентрации. Но при нарушување на микроструктурата на простатата (како на пример при постоење на карцином, бенигна хиперплазија на простатата, акутен простатитис, биопсија, трауми на простатата, по сексуалниот однос, при нејзина масажа и др) доаѓа до продирање на PSA во стромата, а оттаму во лимфните садови и капиларите (Слика 9.1). Присуството во цитоплазмата на епителните клетки, и при бенигните и при малигните промени на простатата, го прави PSA само орган специфичен, но не и тумор специфичен показател. Полуживотот на PSA во серумот изнесува 2.2-3.2 дена.

Главниот проблем при одредувањето концентрацијата на PSA во крвта е неговата способност да се врзе за противхемотрипсинот (ПХТ) во стабилни комплекси, при што доаѓа до комплетно губење на епитопите, како и поради, во помала мера, врзувањето во стабилни комплекси и со α_2-макроглобулинот, при што се јавува само делумно губење на епитопите. Во циркулацијата предоминира комплексот PSA-ПХТ, на кого отпаѓа 86% од целокупниот серумски PSA, додека само мал дел отпаѓа на комплексот PSA-α_2-макроглобулин и слободниот PSA.

Концентрацијата на вкупниот серумски PSA покажува дневна зависност и варира за околу 20%. Врзаната форма на PSA е постабилна одколку слободната форма. Во крвта на пациентите без неопластични промени, се среќава поголемо количество слободен PSA, за разлика од оние со малигни промени, каде доаѓа до зголемување количество на врзан PSA и намалување количината на слободниот PSA. Испитувањата покажале дека околу

45% од варијациите во вкупниот PSA се должат на наследните фактори.

Локацијата на генот одговорен за PSA се наоѓа на



Слика 9.2: Локација на ген за ПСА се наоѓа на 19 хромозом на позиција 19q13.3.

19q13.3 (Слика 9.2). Генот за ПСА има големина од 5,85 Kb и содржи 5 егзони (Слика 9.3).

Неговата експресија е регулирана од андрогените хормони. Во проксималниот дел на промоторот на генот за PSA, на позициите -170 и -194, идентификирани се најмалку две такви врзни места. Подоцна во регионот кој се наоѓа на 3.8-4.8 kb нагорно од местото на почетокот на транскрипцијата, откриен е кластер составен од 3 места кои покажуваат DnaseI-хиперсензитивна активност (DHS). Средното од трите (DHSII, на -4.2 kb) дава најак одговор на андрогените. Понатамошната анализа на DHSII регионот покажала дека поседува еден комплексен клеточно-специфичен и осетлив на андрогени засилувач (enhancer). Најголемиот дел на засилувачот има должина од 440 bp. Во неговиот централен дел се наоѓа високоафинитетно рецепторно врзно место (GGAACATATTGTATC) за адрогените.

Индикациите за одредување на PSA се:

- скрининг на машката популацијата заедно со ДРП и трансректалниот преглед со ултразвук/биопсија, која е над 50 годишна возраст и без симптоми, а во зависност од индивидуалните наоди

- пред почетокот на терапијата, за проценување на стадиумот и агресивноста на карциномот

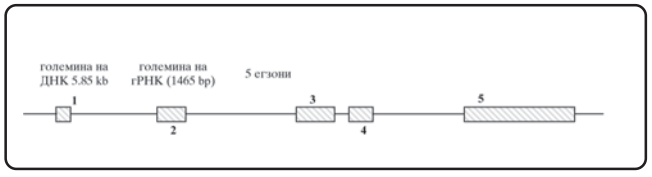
- за следење на состојбата и ефикасноста на терапијата кај болни со карцином на простата

9.4. Изведување на вежбата

9.4.1. Потребен материјал за изведување на вежбата

За одредување на вкупниот и слободниот PSA во серум/плазма неопходни се:

- примерок на серум/плазма;
- пластичен носач за стрипови;
- стрипови (секој стрип има 8 бунарчиња);
- пуфер за плакнење (pH=7.8);
- ProStatus PSA пуфер;
- стандарди за слободени и вкупен PSA (0 мкг/Л; 0.1 мкг/Л; 0.5 мкг/Л; 2.0 мкг/Л; 10 мкг/Л; 50мкг/Л; 250 мкг/Л);
- против-вкупен-PSA-Sm/против-слободен-PSA-Eu детек-тирачки противтела;
- пипети од 25 мкЛ, 100 мкЛ и 200 мкЛ;
- пластични продолжетоци;
- апарат за континуирано мешање;
- апарат за автоматско плакнење;
- флуориметар (Victor^2) за мерење на временски-определена флуресценција.



Слика 9.3: Структура на ген одговорен за PSA.

9.4.2. Припрема на пуфер за плакнење (pH7.8)

Се земаат 40 мЛ од концентратот за плакнење и се префрлаат во чиста колба од 1000 мЛ. Концентратот се разредува 25 пати со додавање на 960 мЛ

дестилирана вода. Вака припремениот пуфер за плакнење е стабилен 2 недели на температура од +2 - +25°С доколку се чува во добро затворен сад.

9.4.3. Припрема на раствор на детектирачки против-вкупен-PSA-Sm/против-слободен-PSA-Eu противтела

Се припрема непосредно пред ставањето во количина не поголема од онаа неопходна за соодветниот број на бунарчиња. За еден стрип е доволно 30 мкЛ од концентриран раствор на детектирачките противтела да се смеша со 3 мЛ на ProStatus PSA пуферот. Треба да се внимава ProStatus PSA пуферот да не дојде во контакт со концентрираниот раствор кој немаме намера да го употребуваме. Се препорачува работниот раствор на обележувачот да се направи во пластичен сад.

9.4.4. Примерок

За одредување концентрацијата на PSA потребно е 1 мЛ примерок. Доколку се користи серум, крвта се зема со венепункција, се остава да се сосири и се одвојува серумот со центрифугирање (5 минути на 4000 ввм). За добивање плазма се користи крв земена со Хепарин или ЕДТА. Хемолитичките (хемоглобин ≤500 мг/дЛ), липемичните (≤125 мг/дЛ) и иктеричните примероци (билирубин ≤30 мг/дЛ) не влијаат врз точноста на одредувањето. Примерок за испитување на вредностите на вкупниот и слободен PSA, не треба да се зема веднаш по ДРП, масажата на простата или трансректалниот преглед со ултразвук. Најмалку 6 месеци по извршената биопсија исто така не треба да се зема крв за одредување на слободен/врзан PSA. Не треба да се користат хемолизирани примероци и примероци кои стоеле несмрзанти повеќе од 24 часа. Како примерок може да се користи и цереброспинална течност, плеврален излив или асцит.

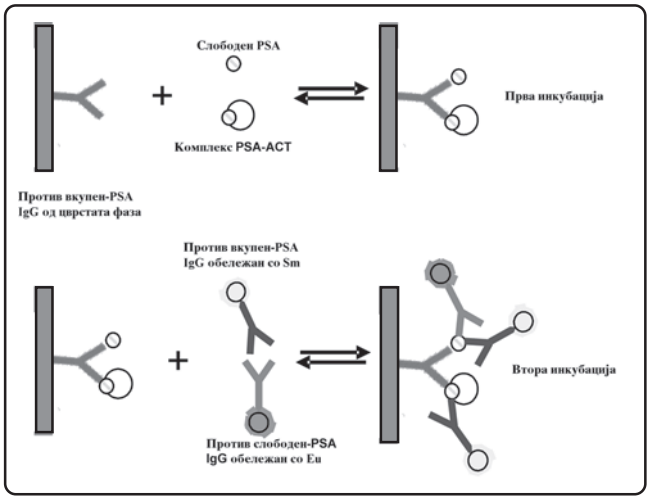
Горната граница на опсегот на тестот изнесува 250 мкг/Л. Доколу се добијат резултати над оваа вредност, тогаш примерокот треба да се разреди 20 пати со DELFIA II разредувачот и повторно да се изведе тестот.

Стабилноста на PSA во примерокот (и кога е во прашање слободиниот и кога е во прашање вкупниот PSA) изнесува околу 24 часа на температура од 4-8°Ц. Доколу е потребно подолготрајно чување на примерокот, тогаш тоа треба да се направи на температури пониски од -25°Ц, за да не дојде до распаѓање на слободниот PSA, што од своја страна може да доведе до лажно позитивни резултати.

9.4.5. Протокол за работа

Денеска постојат најразлични комерцијално достапни тестови за одредување концентрацијата на PSA, кои во основа користат две различни моноклонски противтела. Мерењето на вкупниот PSA се состои во мерењето на слободниот и PSA врзан за α1-antichymotrypsin-от, бидејќи PSA врзан за α2-macroglobulin засега неможе да се одреди (таканаречена "скриена" форма).

DELFIA методот преставува флуороимунометриски тест, од сендвич тип, во кој учествуваат три различни типа на моноклонски противтела. Стандардите, контролите и непознатите примероци кои содржат слободен и врзан (вкупен) PSA подеднакво се врзуваат за специфичните за нив имобилизирачки противтела (цврстата фаза на тестот) врзани за бунарчињата. Вторичните противтела насочени кон епитопите и на слободниот и на вкупниот PSA се обележани со Самариум, додека противтелата насочени само кон епитопите на слободниот PSA се обележани со Еуропиум. Поради тоа противтелата обележани со Еуропиум се врзуваат само за слободниот PSA кој се врзал за цврстата фаза на тестот, додека противтелата обележани со Самариум се врзуваат и за слободниот и за врзаниот (вкупниот) PSA врзан за цврстата фаза



Слика 9.4: Принципот за одредување на слободен/вкупен ПСА во примерокот.

на тестот (Слика 9.4). Иако скоро сите комерцијални тестови се засновани на сличен метод на работа и користат исти моноклонски противтела, резултатите кои ги даваат неможат да се споредат поради разликите во одредувањето како за слободниот така и за α_1-против-хемотрипсин (ПХТ)-комплекс-врзаниот PSA. Поради ова, при следењето на текот на болеста и ефикасноста на терапијата секогаш треба да се користи истиот тип на примерок и истиот тип на комплет за работа.

Сите стандарди и примероци се работат во дупликат. За секој тест треба да се направи нова стандардна права. Сите хемикалии и примероци пред да се почне со работа треба да се загреат на собна температура (+20 до +25^{0}C).

1. Во носачот се стават потребниот број на стрипови (пластични бунарчиња). Вишокот на стрипови се враќаат во пластичното кесе. Од кесето се истиснува воздухот и внимателно се затвора.

2. Се пипетира по 25 мкЛ од PSA стандардите (Ст) и непознатите примероци (Пр) во бунарчињата според прикажаната шема (Слика 9.5, лево).

3. Во секое од бунарчињата се додава по 100 мкЛ од ProStatus PSA пуферот. При ставањето на пуферот треба да се внимава врвот на продолжетокот да не ја допре ниту бунарчето ниту неговата содржина (Слика 9.5, десно).

4. Носачот се инкубира еден час (±5 минути) на собна температура. За време на целата инкубација носачот внимателно се меша.

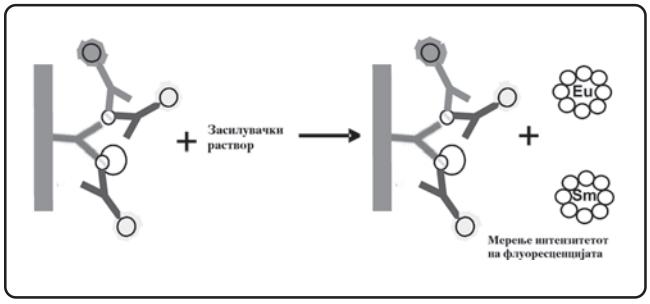
5. Сите бунарчиња се плакнат три пати со пуфер за плакнење.

6. Во секое од бунарчињата се додава по 200 мкЛ од претходно припремен раствор на детектирачки противтела. Додавањето се изведува на ист начин како и додавањето на ProStatus PSA пуферот.

7. Носачот се инкубира два часа (±5 минути) на собна температура. За време на целата инкубација носачот внимателно се меша.

8. Сите бунарчиња се плакнат три пати со пуфер за плакнење.

9. Директно од шишенцето се додава 200 мкЛ од засилувачкиот (enhancenent) раствор во секое бунарче. Растворот за засилување ги откачува јоните на еуропиум и самариум од обележените противтела во растворот. Тука тие формираат хелати со компонентите од засилувачкиот раствор, кои силно флуоресцираат. Флуоресценцијата на



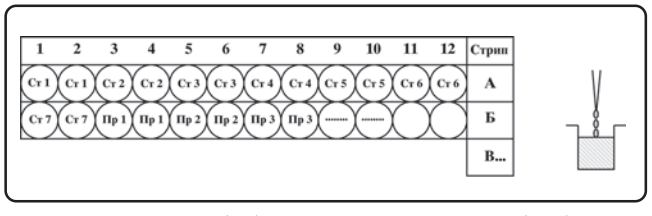
Слика 9.6: Влијание на засилувачкиот раствор врз одредувањето на слободен/вкупен ПСА во примерокот.

еуропиумот е право пропорционална на концентрацијата на слободниот PSA, додека флуоресценцијата на самариумот е пропорционална со концентрацијата на слободниот и врзаниот (вкупниот) PSA (Слика 9.6).

10. Плочата се меша внимателно 5 минути. Иако флуоресценцијата е стабилна неколку часа ако се превенира испарувањето, сепак се препорачува резултатите да се прочитаат во рок од еден час за да се спречи било какво влијание на надворешните фактори. Надворешните фактори, иако многу ретко, можат да предизвикаат намалување на сигналот.

11. Се проверува дали секој стрип е правилно наместен во своето лежиште и се мери флуоресценцијата со помош на флуориметар (Victor^2) кој може да мери временски определена флуоресценција.

12. Пресметување на резултатите. Апаратот Victor^2 содржи програм за автоматско генерирање на стандардни прави од измерените вредности за стандардите, како и за автоматско пресметување на непознатите примероци.



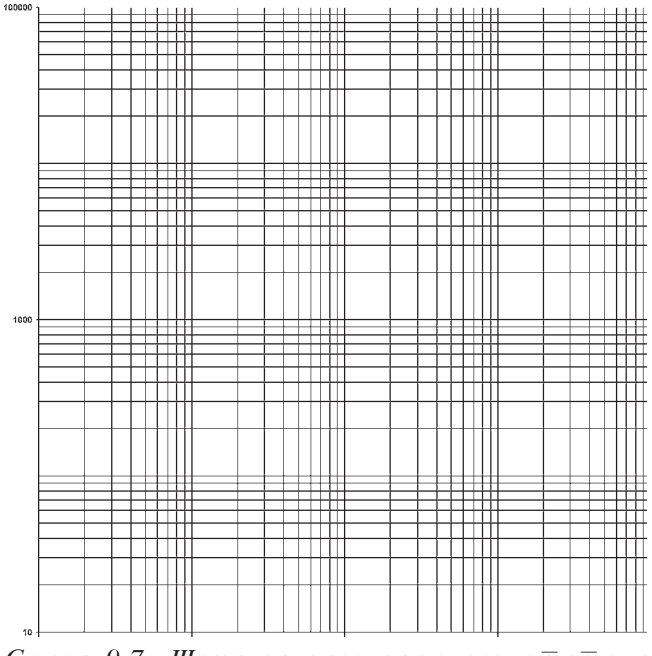
Слика 9.5: Шема за додавање раствори при одредување на слободен/вкупен ПСА во примерокот.

9.4.6. Нормални вредности

Кај здрави луѓе, нормалните вредности на PSA се движат од 0-4 мкг/Л. Бидејќи со текот на возраста концентрацијата на PSA се зголемува за 0.04 мкг/Л, воспоставени се старосно-зависни нормални граници за серумскиот PSA. На Табела 9.2 се дадени нормалните вредности на серумскиот PSA за различни старосни групи. Високодозениот-HOOK ефект не се јавува се додека концентрацијата на PSA не достигне ниво >5000 мкг/Л.

Табела 9.2: Нормални вредности на серумскиот ПСА во крвта, во зависност од возраста.

Возраст (години)	Концентрација (нг/мЛ)
40-49	<2.5
50-59	<3.5
60-69	<4.5
>70	<5.5



Слика 9.7: Шема за внесување резултати и пресметување количините на слободен/вкупен ПСА во примерокот.

Најдено е дека понискиот процент на слободен PSA (под 20%) е повеќе асоциран со поагресивните и со понеповолна прогноза тумори, додека повисокиот процент на слободниот PSA (над 20%, а според некои автори над 15%) е повеќе асоциран со бенигните или подобро локализираните и помалку агресивни, а со тоа и потенцијално полесно излечливите, форми на тумори.

9.5. Задача

1. Да се пресмета концентрацијата на простата специфичниот противген (ПСА) според протоколот опишан во точката 3.5. Резултатите да се внесат во дадената табела (Табела 9.3 и Слика 9.7).

2. Да се протолкува добиениот резултат.

Табела 9.3: Формулар за внесување на резултатите од пресметувањето на концентрацијата на слободниот и вкупен ПСА.

	Слободен PSA		Вкупен PSA			
Стандард/ примерок	ИВС	Концен-трација (мкг/Л)	ИВС	Концен-трација (мкг/Л)	Сооднос с/в PSA	Толкување
Сл. пр.		0		0		
Ст 1		0.1		не се мери		
Ст 2		0.5		0.5		
Ст 3		2.0		2.0		
Ст 4		10		10		
Ст 5		50		50		
Ст 6		250		250		
Пр. 1						
Пр. 2						
Пр. 3						
Пр. 4						
Пр. 5						
Пр. 6						
Пр. 7						
Пр. 8						
Пр. 9						
Пр. 10						

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

БЛОК 4

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 10. АВТОМАТСКО ФЛУОРЕСЦЕНТНО СЕКВЕНЦИОНИРАЊЕ НА ДНК

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- како се врши автоматско секвенционирање на ДНК;
- да протолкуваат резултат од секвенционирање на ДНК;
- да идентифицираат ген од зададена секвенца на ДНК.

ВЕЖБА 11. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СО МОЛЕКУЛСКИ МЕТОДИ

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- како се определуваат полиморфизми со молекулски методи;
- да го определат цитокинскиот полиморфизам од дадена фотографија;
- да го определат полиморфизмот на КИР рецептори од дадена фотографија.

ВЕЖБА 12. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ МУТАЦИИ СО МОЛЕКУЛСКИ МЕТОДИ

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- како да испитаат мутации со молекулски методи;
- како да испитаат познати мутации;
- како да испитаат непознати мутации.

ПОЕНИ:

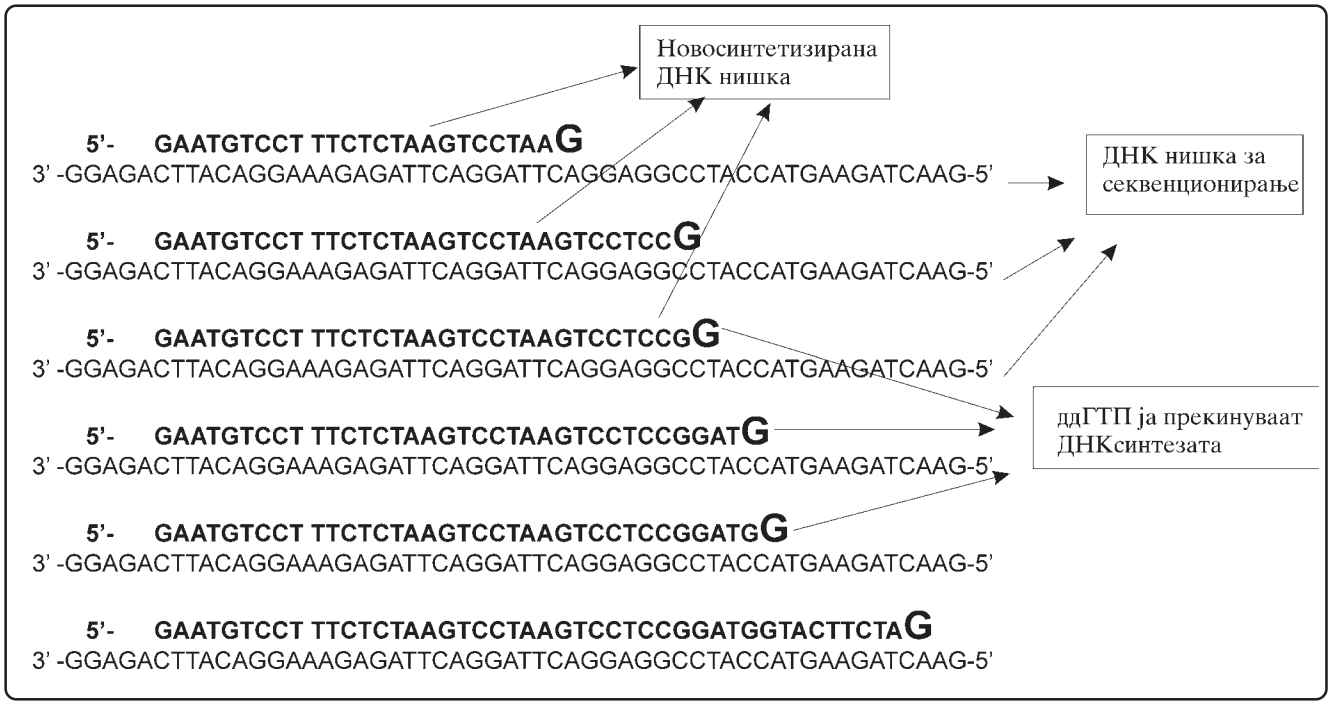
ПРИСУСТВО	0.50 поени
ЗНАЕЊЕ	2.50 поени
ВКУПНО:	3.00 поени

ВЕЖБА 10: АВТОМАТСКО ФЛУОРЕСЦЕНТНО СЕКВЕНЦИОНИРАЊЕ НА ДНК

10.1. Општи принципи

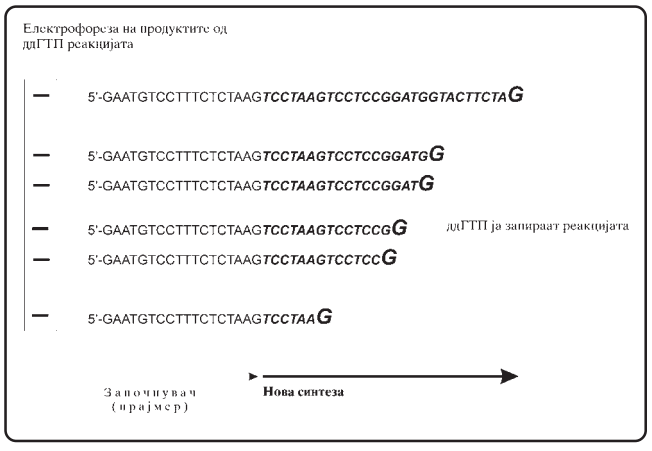
Секвенционирање на ДНК е процес за одредување на примарната структура на ДНК т.е. одредување на нуклеотидниот редослед на одреден ДНК фрагмент. Тоа е исклучително моќна алатка важна од научен аспект за разбирање на генската организацијата и функционирањето на живите суштества, бидејќи овозможува лоцирање на регулаторни генски секвенци, споредби на хомологни гени или откривање на мутации.

Од медицински аспект секвенционирањето на ДНК е важно за идентификување, дијагноза и потенцијално развивање на терапија за разни генетски заболувања. Во 1974 година паралелно беа претставени 2 методи за практично изведување на ДНК секвенционирање, првиот од Американска истражувачка група предводена од Maxam и Gilbert, а вториот од Англиска група на чело со Sanger. Иако двата тима за своите откритија ја поделија Нобеловата награда за хемија во 1980 година, Сангер-овиот метод денес е општо прифатен како стандарден поради неговата практичност.



Слика 10.1: Пример за потенцијално создадени фрагменти од реакција во епрувета што содржи ddGTP при секвенционирање на едноверижна ДНК нишка.

Методот на Maxam-Gilbert е познат и како секвенционирање на ДНК со хемиска деградација, а користи двоверижна ДНК како почетен материјал. Со примена на различни реагенси (диметил сулфат, пиперидин, хидразин) ДНК фрагментот кој се секвенционира се сече на специфични позиции при што се создаваат фрагменти со различна големина, по што следи нивно електрофоретско високо разделно одвојување. Sanger-овиот метод за секвенционирање на ДНК е попознат како *дидеокси секвенционирање* или секвенционирање со прекинување на ДНК веригата. Најпрво ДНК фрегментот за секвенционирање се денатурира до едноверижна ДНК. Следно, на неа се прилепува започнувачот за секвенционирање дизајниран така да неговиот 3' крај е лоциран непосредно до ДНК секвенцата од интерес. Откако започнувачот е прилепен на ДНК нишката за секвенционирање, се одвиваат 4 различни реакции на издолжување (елонгација). За секоја од нив заеднички се четирите "нормални" нуклеотиди и ДНК полимераза, а секоја дополнително содржи по еден од четирите дидеокси нуклеотиди (ddGTP, ddATP, ddTTP или ddCTP). Кога овие модифицирани нуклеотиди се интегрираат во секвенцата доведуваат до прекин на издолжувањето и спречуваат дополнително додавање на "нормални" нуклеотиди поради присуството на водород, наместо хидроксилна група на позицијата јаглерод 3' неопходна за продолжување на синтезата на ДНК во насока од 5' кон 3' крајот. Така, на крајот од издолжувањето, резултат на секоја од различните 4 реакциски раствори ќе биде смеша од фрагменти со различна големина, кои секогаш завршуваат на иста база. На пример, резултатот на реакцијата во епруветката која покрај

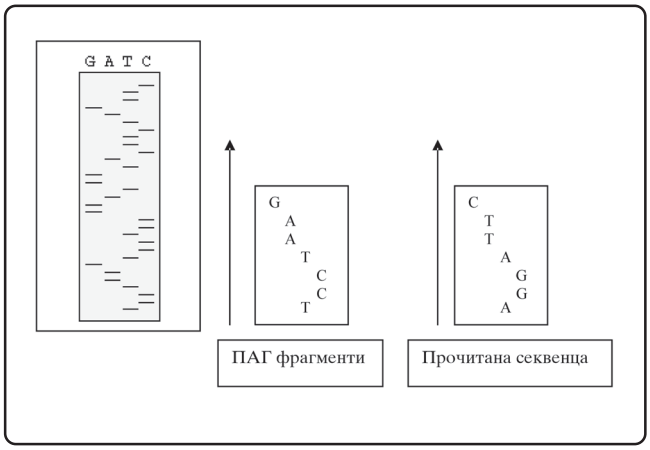


Слика 10.2: Поли акриламид гел електрофореза (ПАГЕ) на продукти од реакција со ддГТП (истата секвенца од слика 10.1).

нормалните нуклеотиди содржи дидеокси Г нуклеотид (ddGTP) е прикажан на Слика 10.1.

По електрофоретското разделување на полиакриламиден гел (ПАГ), потенцијално создадените фрагменти се раздвојуваат според нивната големина. При тоа помалите фрагменти патуваат подалеку отколку подолгите фраг-менти (Слика 10.2).

Ако сите фрагменти добиени во реакциите на секвенционирање во четирите епруветки се комбинираат на еден гел, актуелната ДНК секвенца во 5' кон 3' насока може да се прочита со читање на распоредот на траките почнувајќи од најдалеку отпатуваните траки кон поблиските (Слика10. 3). При тоа треба да се има предвид дека резултантната секвенца е всушност комплементарна на оригиналната нишка која била секвенционирана.



Слика 10.3: ПАГ по дидеокси секвенционирање. Буквите над секоја трака означуваат кој дидеокси нуклеотид бил користен во соодветната реакција (на пр. Г за ддГТП, А за ддАТП итн.). Со читање на распоредот на фрагментите во гелот се добива секвенца комплементарна на почетната. Оригиналната ДНК секвенца се добива по уште едно комплементарно преведување.

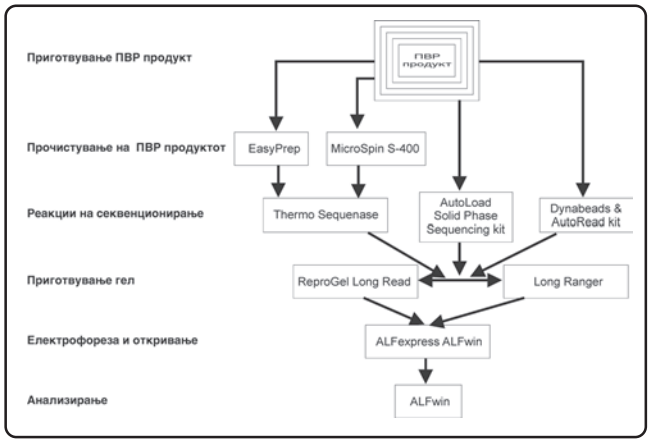
Некои од нив овозможуваат изведување на сите четири реакции во иста епруветка, при што различните дидеокси нуклеотиди се обележени со различни бои кои при ласерското детектирање емитираат светлини со различни бранови должини. Тоа многу ја поедноставува и забрзува постапката на секвенционирање.

Со напредокот на технологијата и молекуларно биолошките техники во последните дваесетина години,

оригиналниот Sanger-ов метод е осовременет, па денес се достапни автоматизирани системи за секвенционирање на ДНК, базирани на оригиналниот принцип на Sanger.

Секвенционирањето на ДНК со автоматизиран секвенционер ALFexpress се врши во неколку стапки (Слика 10.4):

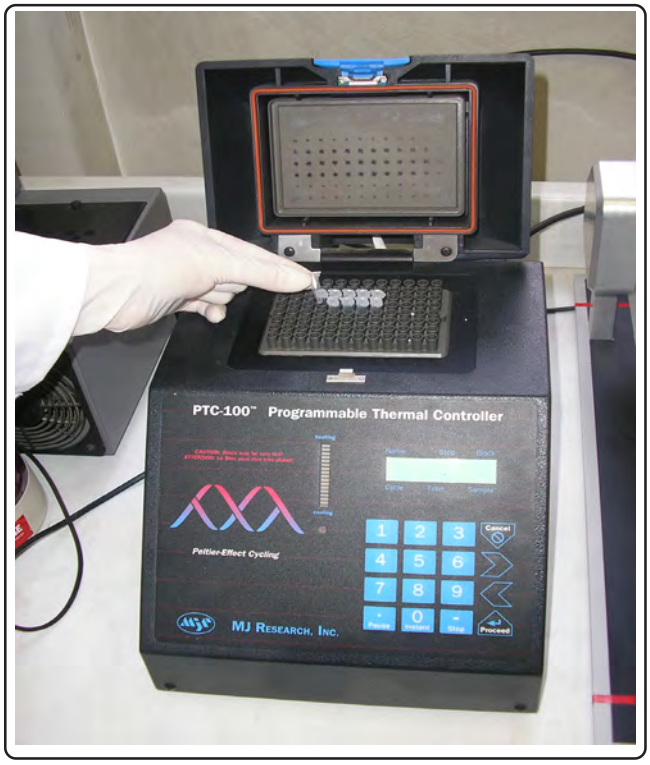
1. Приготвување на ПВР од примерокот;
2. Прочистување на ПВР продуктот;
3. Секвенционирање;
4. Приготвување гел;
5. Електрофореза и детекција; и
6. Евалуација



Слика 10.4: Шематски приказ на постапките за секвенционирање на денатурирачка полиакриламид гел електрофореза со секвенционер ALFexpress.

10.2. Полимеразно верижна реакција (ПВР)

ПВР се изведува во 50 мкЛ и содржи 50-200 нг ДНК, 20 нМ од прајмерите, 5 мкЛ 10 х пуфер за ПВР (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 15 mM $MgCl_2$), 0.5 мкЛ од смешата 4 х дНТП (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, секој во концентрација од 20 мМ) и 2.5 единици од Так полимераза. Реакцијата за амплификација се изведува во термосајклер (Quatro, UK), а се состои од 40 циклуси на денатурација на 94^0Ц (1 мин), анилирање на 55^0Ц (1 мин) и издолжување на 72^0Ц (1 мин), по што следуваат 5 мин на 72^0Ц. Сите реагенси се содржани во комерцијално достапниот комплет HLA DRBplus Typing Kit (Amersham-PharmaciaBiotech, Upsala, Sweden). Во



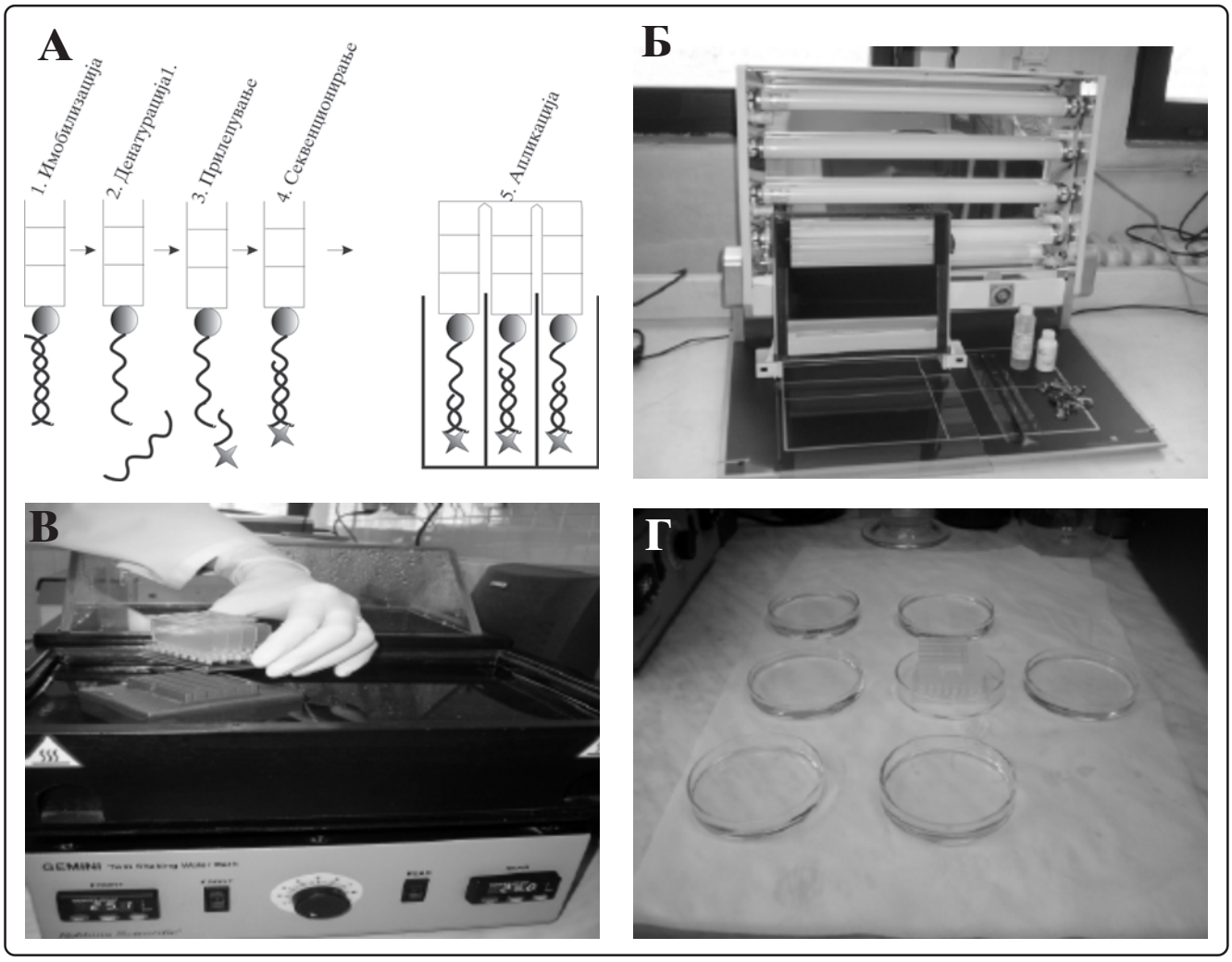
Слика 10.5: Полимеразно верижна реакција за секвенционирање на цврста фаза.

секоја амплификација се вклучува негативна контрола (слепа проба), а 5 мкЛ од продуктите на реакцијата се проверувани на 1.5% агарозен гел (Слика 10.5).

10.3. Секвенционирање

10.3.1. Секвенционирање на цврста фаза

Продуктите од ПВР се секвенционираат на цврст носач со комплет за секвенционирање (AutoLoad Solid Phase Sequencing Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden). Реакцијата за секвенционирање се изведува во неколку фази (Слика 10.6). Во фазата на имобилизација 45 мкЛ од биотинилираниот продукт добиен со ПВР се закачува за специјално дизајнирани чешли што содржат стрептовидин, по што следи денатурација на примерокот со натриум хидрооксид. Имобилизираната едноверижна секвенца се користи како матрица за реакцијата на дидеокси секвенционирање, според методот на Сангер, со започнувач



Слика 10.6: А, фази од секвенционирање на цврста фаза; Б, РепроСет за правење гел за секвенционирање; В, поставување на чешлите во термостат со прецизна топлотна регулација; Г, Петриеви плочи со раствори за плакнење на чешлите.

(прајмер) обележен со флуоресцентната боја Cy5 (5'-Cy5-GAG TGT CAT TTC TTC AA-3').

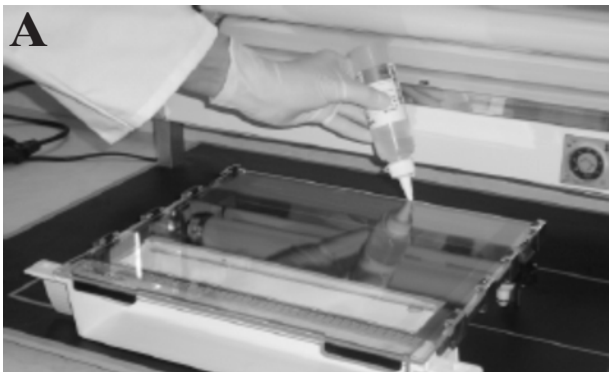
10.3.2. Денатуирирачка полиакриламид гел електрофореза

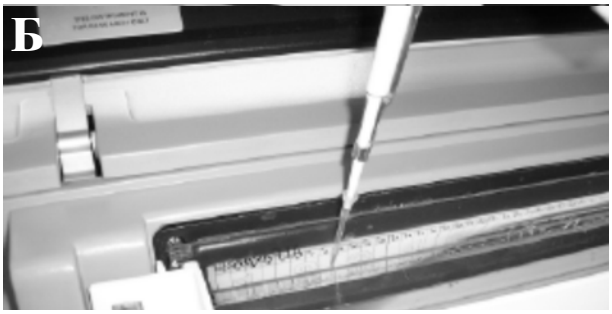
Продуктите од оваа реакција се нанесуваат на денатурирачки полиакриламиден гел (7 М уреа, 6% полиакриламид во 1 х ТБЕ) и електрофоретски се раздвојуваат (300 мин на 55^{0}Ц, 1500 В, 60 мА и 30 W) со 0.6 х ТБЕ како пуфер за течење на автоматски секвенционер ALFexpress (Слика 10.7).

10.3.2.1. Софтверска анализа на секвенците

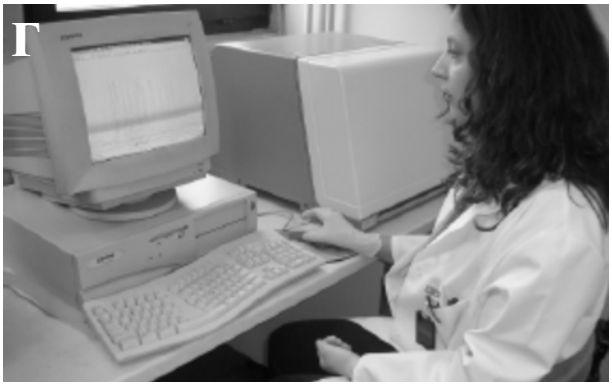
Анализа на секвенците се врши со ALFwin Sequnece Analyser. Најпрвин се анализира електрофоретскиот наод на гелот. Секвенците се прикажуваат во облик на линии по 4 во еден клон, односно еден примерок (Слика 10.8). Вкупно можат да се анализираат 40 електрофорези, односно 10 клонови (примероци) по 4 електрофорези (по една за секоја база).

Во следната фаза се обработуваат електрофорезните наоди во облик на криви (Слика 10.9) во четири различни бои. Доколку е потребно се врши корекција на

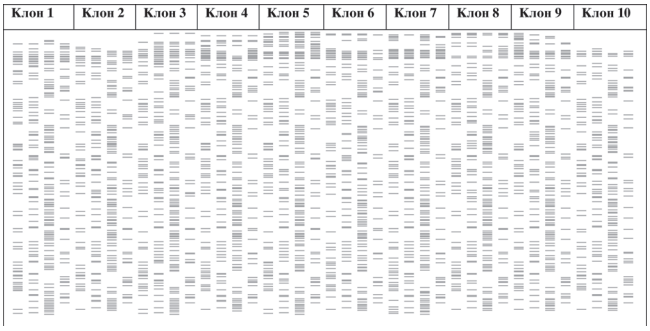








Слика 10.7: А, излевање на полиакриламиден гел; Б, чистење на ведренцата; В, поставување чешли со секвенционирани примероци; В, Контролирање на кривите од ДНК секвенците.

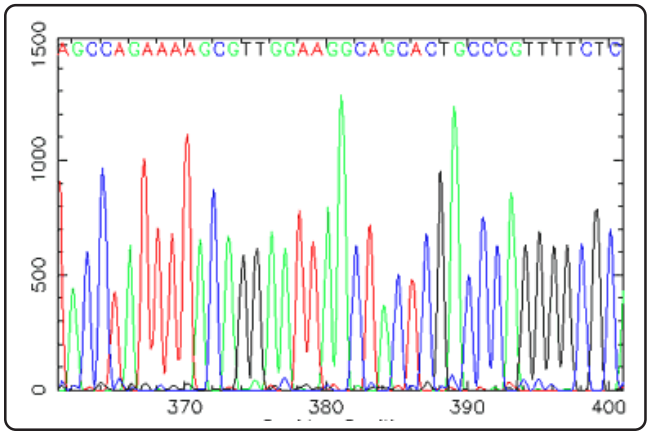


Слика10.8: Приказ на секвенците после денатурирачка полиакриламид гел електрофореза на ALFexpress.

добиените секвенцни криви (се додаваат, се менуваат или се бришат бази во секвенцата).

Особено внимание се обрнува на двојбените (амбигвитетните) комбинации, кои се прикажуваат со определени кодови:

M	A C
R	A G
W	A T
S	C G
Y	C T
K	G T
V	A C G
H	A C T
D	A G T
B	C G T
N	A C G T

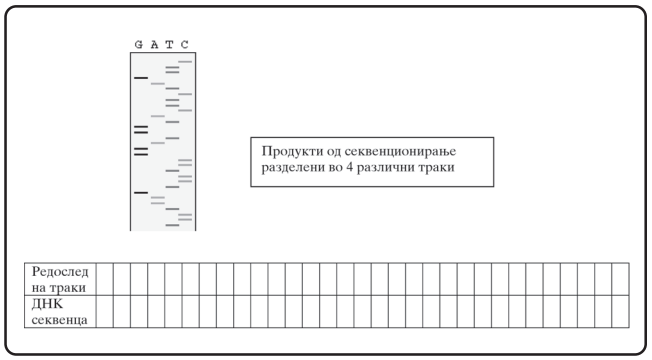


Слика 10.9: Претворање на секвенците во криви, идентификација на базите и на абигвитетните (двојбените) комбинации на денатурирачка полиакриламид гел електрофореза со секвенционер ALFexpress.

Секвенците можат да се прикажуваат како триплети, октети или како блокови од по десет бази, зависно како сакаме да ги прикажеме резултатите. Резултатите можат да се подготват за користење во други програми (ASCI, и други).

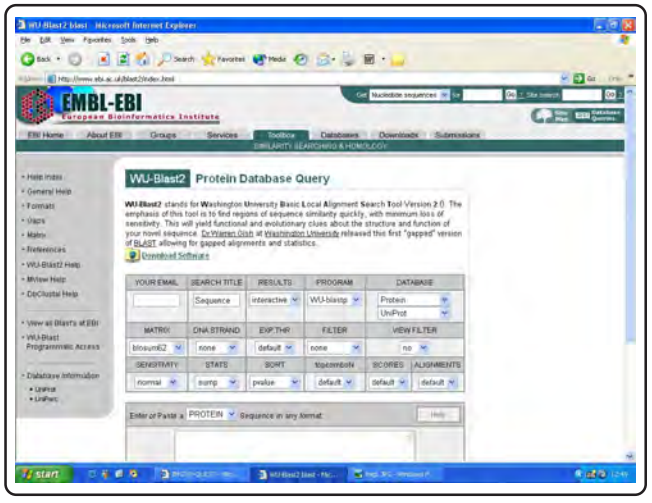
10.4. Задачи за студентот

1. Протолкувај ја електрофорезата (распоредот на траки) добиени со раздвојување на продуктите од дидеокси реакција на секвенционирање (Слика 10.10), а потоа и ДНК секвенцата која произлегува од таа електрофореза.



Слика 10.10: Формулар за внесување резултати од толкувањето на ПАГЕ на секвенциониран продукт со користење на дидеокси нуклеотид.

2. Секој студент треба да определи на кој ген припаѓаат две до пет од долните секвенци (по избор), користејќи бази на ДНК секвенци на интернет (Слика 10.11):



Слика 10.11: Влезниот екран за определување на кој ген му припаѓа некоја позната секвенца од ДНК.

http://imgt.cines.fr/cgi-bin/IMGTdnap.jv?livret=0&Option=humanIg, http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html?

2.1.

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
GCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAG
TGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACC
ATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGA

2.2.

CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
GCTTCTGGATTCACCTTTACTAGCTCTGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAG
TGGATAGGATGGATCGTCGTTGGCAGTGGTAACACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACC
ATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGGCAGA

2.3.

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAG
GGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAG
TGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGTACCACACATAGCGCCTTCCAAGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCAG

2.4.

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG
GCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAG
TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACG
ATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGA

2.5.

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCTGAAGCCCCCAGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGTTCT
GGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGCTGTAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAAAGGCTCCCAAA
CTCCTCATCTATTATGATGATCTGCTGCCCTCAGGGGTCTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
ACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGG
GATGACAGCCTGAATGGTCC

2.6.

CTTCAATGGGACGGAGCGGGTGCGGTTGCTGGAAAGATGCATCTATAACCAAGAGGAGTCCGTGCGCTT
CGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGACGGAGCTGGGGCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAG
CCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAGGCGGGCCGCGGTGGACACCTACTGCAGACACAACTACGGGGTTGG
TGAGAGCTTCACAGTGCAGCGGCGAGTTGAGCCTAAGGTGACTGTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCT
GCAGCACCACAACCTCCTGGTCTGCTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGGTGGTT
CCGGAACGGCCAGGAAGAGAAGGCTGGGGTGGTGTCCACAGGCCTGATCCAGAATGGAGATTGGACCTT
CCAGACCCTGGTGATGCTGGAAACAGTTCCTCGGAGTGGAGAGGTTTACACCTGCCAAGTGGAGCACCC
AAGTGTGACGAGCCCTCTCACAGTGGAATGGAGAGCACGGTCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAG
TGGAGTCGGGGGCTTCGTGCTGGGCCTGCTCTTCCTTGGGGCCGGGCTGTTCATCTACTTCAGGAATCA
GAAAGGACACTCTGGACTTCAGCCAACAGGATTCCTGAGCTGA

2.7.

ATGATCCTAAACAAAGCTCTGCTGCTGGGGGCCCTCGCTCTGACCACCGTGATGAGCCCCTGTGGAGGT
GAAGACATTGTGGCTGACCACGTTGCCTCTTTGTGGTGTAAACTTGTACCAGTTTACGGTCCCTCTGGC
CAGTACACCCATGAATTTGATGGAGATGAGGAGTTCTACGTGGACCTGGAGAGGAAGGAGACTGCCTGG
CGGTGGCCTGAGTTCAGCAAATTTGGAGGTTTTGACCCGCAGGGTGCACTGAGAAACATGGCTGTGGCA
AAACACAACTTGAACATCATGATTAAACGCTACAACTCTACCGCTGCTACCAATGAGGTTCCTGAGGTC
ACAGTGTTTTCCAAGTCTCCCGTGACACTGGGTCAGCCCAACACCCTCATTTGTCTTGTGGACAACATC
TTTCCTCCTGTGGTCAACATCACATGGCTGAGCAATGGGCAGTCAGTCACAGAAGGTGTTTCTGAGACC
AGCTTCCTCTCCAAGAGTGATCATTCCTTCTTCAAGATCAGTTACCTCACCTTCCTCCCTTCTGCTGAT
GAGATTTATGACTGCAAGGTGGAGCACTGGGGCCTGGACCAGCCTCTTCTGAAACACTGGGAGCCTGAG
ATTCCAGCCCCTATGTCAGAGCTCACAGAGACTGTGGTCTGCGCCCCTGGGGTTGTCTGTGGGCCTCGTG
GGCATTGTGGTGGGCACTGTCTTCATCATCCAAGGCCTGCGTTCAGTTGGTGCTTCCAGACACCAAGGG
CCATTGTGA

2.8.

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTTGCCT
GCTGCCTTCCCTGCCCCAGTACCCCCAGGAGAAGATTCCAAAGATGTAGCCGCCCCACACAGACAGCCA
CTCACCTCTTCAGAACGAATTGACAAACAAATTCGGTACATCCTCGACGGCATCTCAGCCCTGAGAAAG
GAGACATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAAAGCAGCAAAGAGGCACTGGCAGAAAACAACCTGAACCTT
CCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCCAATCTGGATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTGAAAATC
ATCACTGGTCTTTTGGAGTTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTGAGGAA
CAAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTACAAAAGTCCTGATCCAGTTCCTGCAGAAAAAGGCAAAGAATCTA
GATGCAATAACCACCCCTGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAGGCACAGAACCAG
TGGCTGCAGGACATGACAACTCATCTCATTCTGCGCAGCTTTAAGGAGTTCCTGCAGTCCAGCCTGAGG
GCTCTTCGGCAAATGTAG

2.9.

ATGGAGTCCTCAGGCAACCCAGAGAGCACCACCTTTTTTTACTATGACCTTCAGAGCCAGCCGTGTGAG
AACCAGGCCTGGGTCTTTGCTACCCTCGCCACCACTGTCCTATACTGCCTGGTGTTTCTCCTCAGCCTA
GTGGGCAACAGCCTGGTCCTGTGGGTCCTGGTGAAGTATGAGAGCCTGGAGTCCCTCACCAACATCTTC
ATCCTCAACCTGTGCCTCTCAGACCTGGTGTTCGCCTGCTTGTTGCCTGTGTGGATCTCCCCATACCAC
TGGGGCTGGGTGCTGGGAGACTTCCTCTGCAAACTCCTCAATATGATCTTCTCCATCAGCCTCTACAGC
AGCATCTTCTTCCTGACCATCATGACCATCCACCGCTACCTGTCGGTAGTGAGCCCCCTCTCCACCCTG
CGCGTCCCCACCCTCCGCTGCCGGGTGCTGGTGACCATGGCTGTGTGGGTAGCCAGCATCCTGTCCTCC
ATCCTCGACACCATCTTCCACAAGGTGCTTTCTTCGGGCTGTGATTATTCCGAACTCACGTGGTACCTC
ACCTCCGTCTACCAGCACAACCTCTTCTTCCTGCTGTCCCTGGGGATTATCCTGTTCTGCTACGTGGAG
ATCCTCAGGACCCTGTTCCGCTCACGCTCCAAGCGGCGCCACCGCACGGTCAAGCTCATCTTCGCCATC
GTGGTGGCCTACTTCCTCAGCTGGGGTCCCTACAACTTCACCCTGTTTCTGCAGACGCTGTTTCGGACC
CAGATCATCCGGAGCTGCGAGGCCAAACAGCAGCTAGAATACGCCCTGCTCATCTGCCGCAACCTCGCC
TTCTCCCACTGCTGCTTTAACCCGGTGCTCTATGTCTTCGTGGGGGTCAAGTTCCGCACACACCTGAAA
CATGTTCTCCGGCAGTTCTGGTTCTGCCGGCTGCAGGCACCCAGCCCAGCCTCGATCCCCCACTCCCCT
GGTGCCTTCGCCTATGAGGGCGCCTCCTTCTACTGA

2.10.

CTGTCTGCACCGGCAGCACCATGTCGCTCACGGTCGTCAGCATGGCGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGC
AGGGGGCCTGGCCACATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCCACCCAGGTCGCCTGGTGA
AATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCATGTTTGAACACTTCCTTCTGCACAGAG
AGGGGATGTTTAACGACACTTTGCGCCTCATTGGAGAACACCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAACTTCT
CCATCAGTCGCATGAGGCAAGACCTGGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCCCT
ATCAGTTGTCAGCTCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTGATCATAGGTCTATATGAGAAACCTTCTCTCT
CAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAATGTGACCTTGTCCTGCAGCTCCCGGAGCTCCT
ATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCCTGCAGGGACCAAGGTCA
ACGGAACATTCCAGGCCAACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCATGGAGGGACCTACAGATGCTTCGGCT
CTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAAGTCAAGTGACCCACTGCTTGTTTCTGTCACAGGAAACC
CTTCAAATAGTTGGCCTTCACCCACTGAACCAAGCTCCGAAACCGGTAACCCCAGACACCTACATGTTC
TGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATCCCTTTCACCATCCTCCTCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGCT
CCGACAAAAAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGATT
CTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGCATAATTGGATCACTGTGTTTT

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

ВЕЖБА 11: ОПРЕДЕЛУВАЊЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СО МОЛЕКУЛСКИ МЕТОДИ

11.1. Вовед

Различни верзии на една секвенца од ДНК во една определена хромозомска локација (***локус***) се наречуваат ***алели***. Кога се алелите чести и се наоѓаат во повеќе од 1% во популацијата зборуваме за ***генетски полиморфизам***. Алелите кои имаат помала фрекфенција од 1% се наречуваат ***ретки алели (варијанти)***. Некои алели покажуваат промени во секвенцата на ДНК поставена помеѓу гените или во нивните интрони, немаат влијание врз функцијата на било кој ген и можат да се откријат само со директна анализа на ДНК. Други промени во секвенцата се сместени во кодирачкиот дел од гените и можат да доведат до создавање различни варијанти протеини кои прикажуваат драстично различни фенотипи.

Испитувањето варијации во протеините има големо практично значење, понекогаш и поголемо од полиморфизмот на ДНК. Но, во други случаи (како што е трансплантацијата на коскената срцевина) полиморфизмот на ДНК и неговата идентичност помеѓу дарителот и примателот, има пресудно значење за успешност на постапката. Полиморфните алели во регулаторните подрачја можат да имаат значајни дејства врз интензитетот на реакциите и да остваруваат генска регулација.

11.2. Молекулско определување полиморфизам на цитокините

Цитокините можат да се дефинираат како мали протеини (молекулска маса 8-80 кДа) кои влијаат врз клетката која ги произведува (***автокрин ефект***) или врз соседните клетки (***паракрин ефект***). Создавањето на овие молекули е привремено и многу прецизно регулирано. Денес се познати над 100 различни цитокини во човекот и постојано се откриваат нови цитокини.

Во оваа вежба го користиме со комплетот за генотипизирање цитокини (Табела 11.1), метода базирана врз

Табела 11.1: Анализираните гени, типизираните полиморфизми и хромозомската локализација на цитокинскиот полиморфизам во склоп на 13. Работилница за цитокинска антропологија (Seattle, 2002).

Локус (ген)	Полиморфизми	Генска локализација
IL-1	IL-1 -889	2q14
IL-1	IL-1 -511	2q14
	IL-1 +3962	
IL-1R	IL-1R pstl1970	2q12
IL-1RA	IL-1RA mspa111100	2q14.2
IL-4R	IL-4R +1902	16p11.2-12.1
IL-12B	IL-12B -1188	5q31.1-q33.1
IFN	IFN +874	12q14
TGF- 1	TGF- 1 cdn10	19q13.2
	TGF- 1 cdn25	
TNF-	TNF- -308	6p21.3
	TNF- -238	
IL-2	IL-2 -330	4q26-q27
	IL-2 +160	
IL-4	IL-4 -1098	5q31.1
	IL-4 -590	
	IL-4 -33	
IL-6	IL-6 -174	7p21
	IL-6 nt565	
IL-10	IL-10 -1082	1q31-q32
	IL-10 -819	
	IL-10 -590	

полимеразно верижна реакција (ПВР) со цел да се открие полиморфизмот на 13 цитокински гени. Комплетот се состои од различни формулации на смеши со различни лиофилизирани започнувачи (прајмери) кои се употребуваат за да се намножи геномската ДНК со употреба на пластичен носач од 96 ведренца наменет за два примероци.

11.2.1. Потребно за работа

За генотипизирање на цитокинскиот полиморфизам неопходни се:

- Пластичен носач од 96 ведренца исполнет со лиофилизирани започнувачи.
- 140 мкЛ пуфер за ПВР.
- Затворачи за пластичниот носач.
- Шеми за толкување.
- SCORE софтвер.
- Так ДНК полимераза.
- Стерилна вода.
- Микропипетори и пластични продолжетоци.
- Топлотен циклер (сајклер) способен да носи 96 ведренца.
- ТБЕ пуфер за електрофореза.
- Агароза.
- Етидиум бромид.
- Апарат за електрофореза.
- Примерок од ДНК.

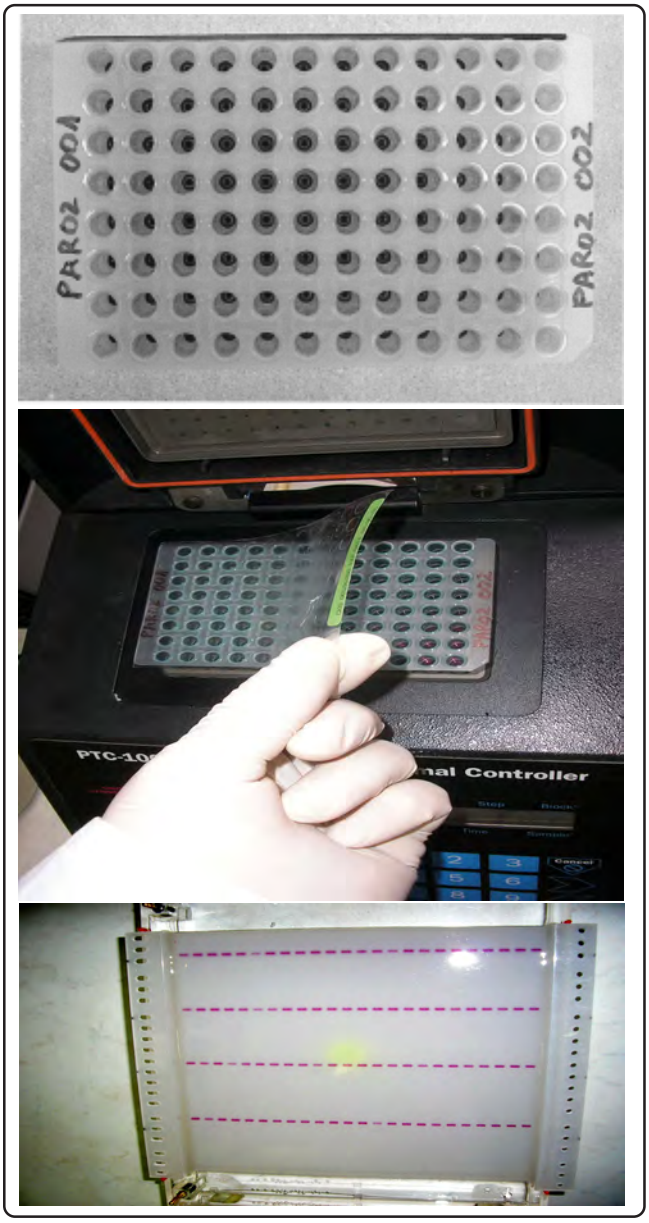
11.2.2. Услови за топлотно циклирање

Топлотното циклирање се врши според долната шема:

• 1. Стапка		2 мин на 94°Ц
• 2. Стапка 10 циклуси	94°Ц	10 секунди
	65°Ц	60 секунди
• 3. Стапка 20 циклуси	94°Ц	10 секунди
	61°Ц	50 секунди
	72°Ц	30 секунди
• Чување	4°Ц	дефинирано време

11.2.3. Протокол за работа

Методата се изведува со мешање на пуферот со примероците од човечка ДНК и Так ДНК полимераза, распоредување во 96 ведренца, затворање и топлотно циклирање. Одкога ќе заврши циклирањето, продуктите од ПВР се поставуваат во 2% агарозен гел за електрофореза (Слика 11.1). По завршената електрофореза, гелот во кој има етидиум бромид се осветлува со ултравиолетно светло и се фотографира. Резултатите од фотографијата се интерпретираат со компјутерски програм или со специјални шеми приготвени за оваа намена.

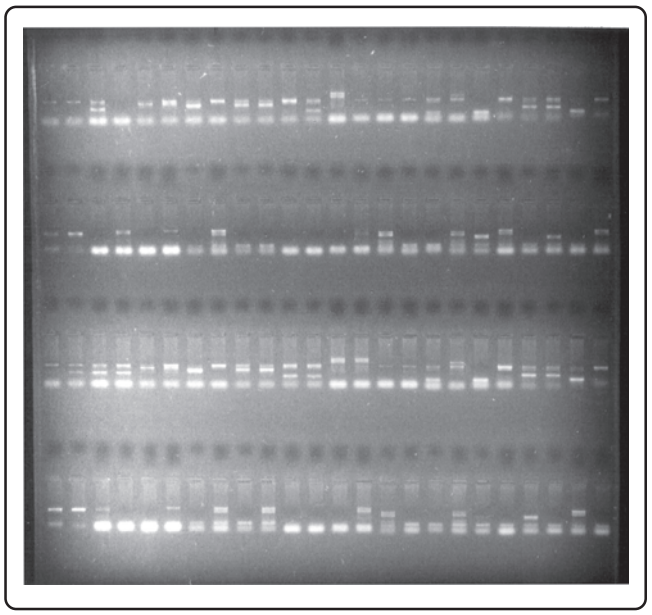


Слика 11.1: Поставување метод за цитокински полиморфизам (горе); полимеразно верижна реакција на цитокински полиморфизам (средина); електрофореза од два пациенти со цитокински полиморфизам (долу).

11.2.4. Толкување на резултатите

Резултатите од испитаникот се анализираат од фотографијата така што се внесуваат внатрешните контроли и специфичните амплификати во компјутерскиот програм SCORE и со него се анализираат резултатите, се складираат и се печатат (Слика 11.2).

Анализата на цитокинскиот полиморфизам се врши со истиот компјутерски програм и се добиваат цитокински алели и хаплотипови (Слика 11.2).



Слика 11.2: Фотографија од електрофореза на цитокински полиморфизам од два испитаници.

Анализата на цитокинскиот генски полиморфизам може да се направи и врз основа на специјални формулари во кои се внесуваат позитивните ампликони за секој одделен цитокин (Слика 11.9).

Значењето на цитокинскиот полиморфизам може да се разгледува како влијание врз цитокинските функции (прикажување, концентрација, активност на цитокините), како и здруженост и/или отпорност кон различни болести. Значењето на генетските полиморфизми е огромно и може да се користи во:

1. Антропологија (за проучување потеклото на човекот, биолошките варијации помеѓу различни народи, етнички групи и изолати, миграции и друго).

2. Медицинска генетика (за мапирање ген во определено подрачје од хромозомот со анализа на поврзаност; пренатална дијагноза на генетските болести; откривање хетерозиготни носители на генетско заболување; испитување на лица со висок или низок ризик за развој на возрасни заболувања (коронарна срцева болест, канцер, дијабет); утврдување родителство; идентификација на жртви од криминал; потврдување сомнителни извршители на криминални дела; и типизирање ткива за трансплантација на органи.

11.3. Полиморфизам на гените за КИР (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor)

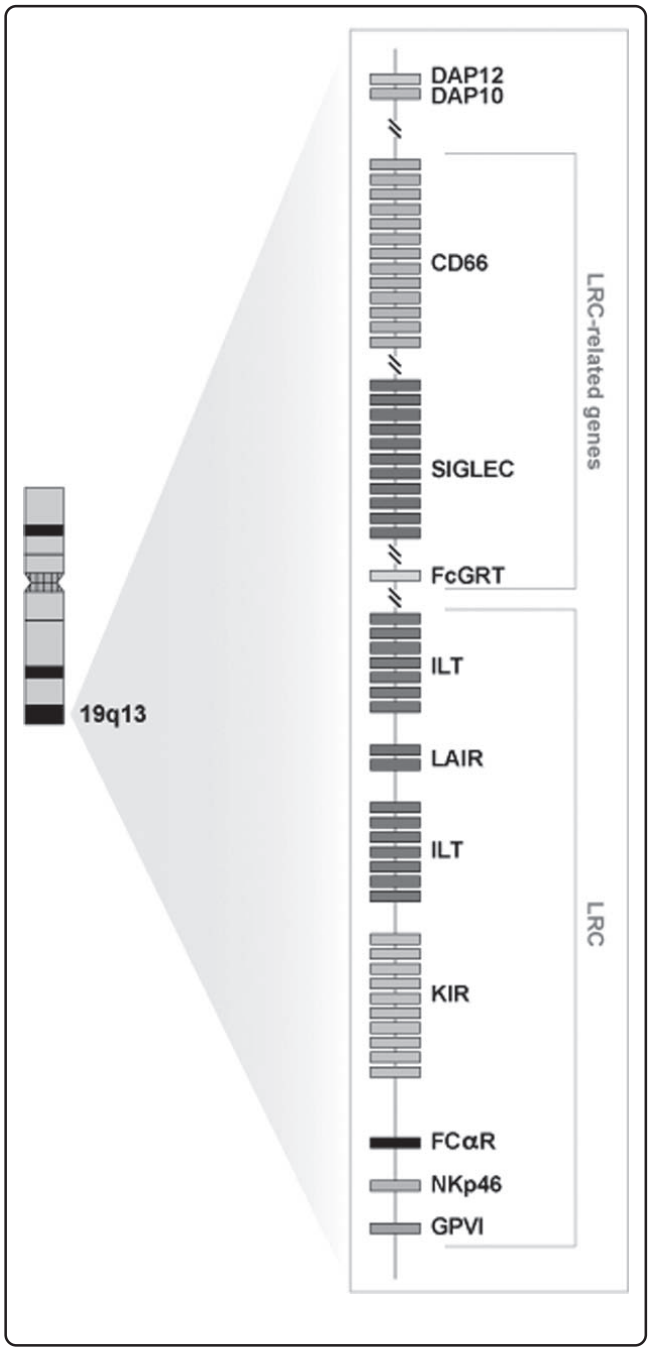
11.3.1. Вовед

КИР (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor) се членови на група регулаторни молекули кои се наоѓаат во дел од лимфоидните клетки. Тие се прв пат идентификувани според нивната способност да влијаат врз цитолизата предизвикана од клетките природни убијци. КИР локусот, кој содржи фамилија од полиморфни и високо хомологни гени, се наоѓа во хромозомот 19q13.4 во склоп на 1 Мб леукоцитен рецепторен комплекс (Слика 11.3). КИР гените се распоредени во должина од околу 150 кб со исклучително голема варијабилност помеѓу хаплотиповите.

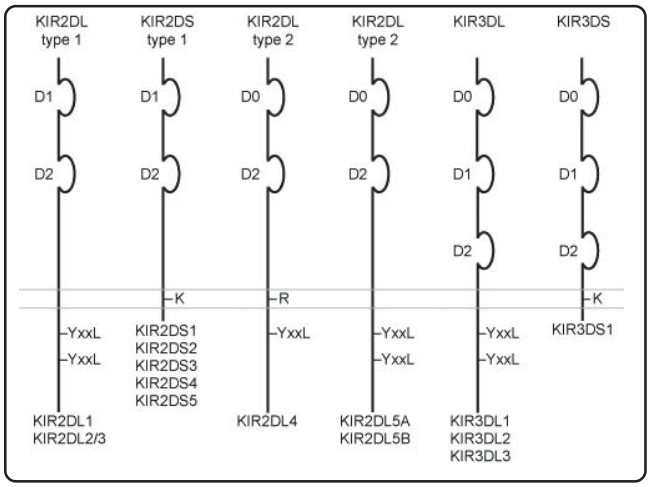
11.3.2. Означување (номенклатура) на КИР

Идентификувани се околу 14 гени за КИР и предложени се два системи за нивно означување (номенклатура). Најчесто употребуваниот систем за означување ја зема предвид нивната протеинска структура која се состои од четири главни подподелби врз основа на две особини: бројот на екстрацелуларните Иг (имуноглобулински) домени (2Д или 3Д) и особините на цитоплазматскиот дел (Слика 11.4).

Второто означување се врши според номенклатурата на *кластерите за диференцијација (ЦД)*, како ЦД158а, ЦД158б и слично. Денес во светот доминира првото означување (предложено и прифатено од HUGO = Human Genome Organization).



Слика 11.3: Карта на леукоцитниот рецепторен комплекс (ЛРЦ). Во овој локус се наоѓаат најмалку 40 членови од суперфамилија во подрачјето 19q13. Адаптер гените DAP12 (KARAP) и DAP10 (KAP) се наоѓаат центромерно на 19q13.1. Во ЛРЦ подрачјето се наоѓаат гените за ИЛТ и КИР, како и гените кои ги кодираат FcαR, активирачкиот рецепторен ген NKp46 и колаген врзувачкиот рецептор GPV1.



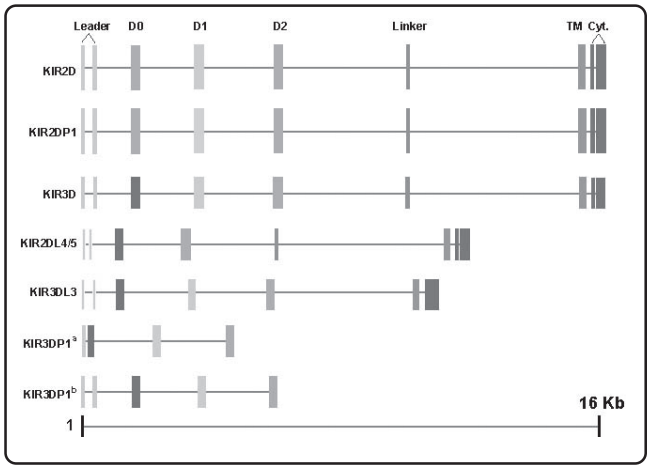
Слика 11.4: Структура на домените на КИР молекулите. КИР гените се членови на Иг-суперфамилијата и прикажуваат молекули со два или со три екстрацелуларни имуноглобулиновидни домени. Цитоплазматските домени од инхибиторните рецептори содржат ITIM (I/VxYxxL/V) секвенци, додека наполнетите аминокиселински остатоци (кои ја фацилитираат адапторската молекула DAP12/ KARAP) се наоѓаат во трансмембранскиот дел од активните рецептори. KIR2DL4 содржи секвенца со активирачки и со инхибирачки рецептори.

Независно од бројот на Иг поединици, цитоплазматскиот домен може да биде било долг (означен со L) или кус (означен со S). КИР со долги цитоплазматски домени се инхибиторни поради присуството на имунорецепторните тирозински-базирани инхибициски мотиви (ITIMs) присутни врз нивните цитоплазматски домени. Кусите КИР пренесуваат активирачки сигнали преку нивно меѓудејство со адапторната молекула DAP-12 (DNAX активирачки протеин од 12 кД. Оваа молекула е исто така позната и како килер клеточно активирачки рецепторно-асоциран протеин или KARAP), кој содржи имунорецепторски тирозин-базирани активирачки мотиви (ITAMs). Најдени се многу варијации за најголемиот број КИР гени, а нивната номенклатура е слична на таа што се употребува за ХЛА алелите.

11.3.3. Егзон-интрон структура на КИР гените

Организацијата на егзон-интрон структурата на

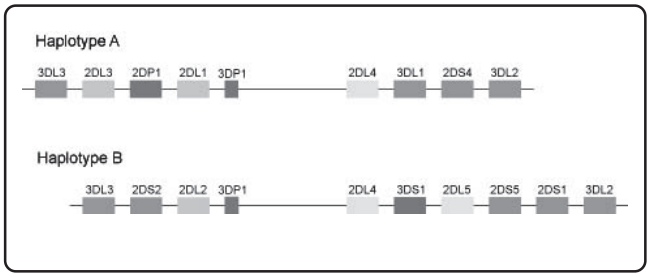
различните КИР гени е прилично константна со следниве особини: сигналната секвенца ја кодираат првите два егзони, а секој Иг домен (Д0, Д1 и Д2, почнувајќи од амино-крајот) соодветствува на единечен егзон (егозните 3-5), поврзувачот (линкерот) и трансмембранските подрачја ги кодира по еден одделен егзон (егзоните 6 и 7), а цитоплазматските домени ги кодираат двата последни егзони (Слика 11.5).



Слика 11.5: Егзон-интрон структура на КИР гените. Егзоните кои кодираат различни домени од КИР молекулите се следниве: егзон 1 и 2, лидер (водечка) секвенца; егзоните 3-5 за Иг домените Д0, Д1 и Д2; егзоните 6 и 7 за поврзувачки (линкерни) и трансмембрански подрачја; и егзоните 8 и 9 за цитоплазматските домени. Тип 1 дводоменските КИР гени (КИР2ДЛ1, 2ДЛ2/3 и сите 2ДС гени) имаат идентична геномска организација со тие што кодираат КИР молекули со три Иг домени, но егзоној 3 (кој кодира Д0) е псевдоегзон. Егзоној 3 е исто така псевдоегзон во КИР2ДП1, кој содржи и псевдоегзон 4. Тип 2 дводоменските КИР, во кои спаѓаат 2ДЛ4, 2ДЛ5А и 2ДЛ5Б се карактеризираат со целосно отсуство на егзон 4.

11.3.4. Редослед на КИР гените и хаплотипска варијабилност

Редоследот на КИР гените долж хромозомот е утврден за два различни хаплотипа (Слика 11.6). Гените се организирани во облик на глава-до-опашка, а секој ген зазема 10-16 кб во должина со секвенца од околу 2 кб кои го одвојува секој ген, освен 14 кб оддалеченост пред 2ДЛ4 генот. Варијациите на КИР генскиот комплекс е зависен од алелскиот полиморфизам на неколку КИР гени и варијабилност на бројот и типовите гени присутни во еден хаплотип.



Слика 11.6: Генскиот редослед на два целосно секвенционирани КИР хаплотипови. Гените се организирани во облик на глава-до-опашка, а секој ген зазема околу 10-16 кб во должина со секвенца од 2 кб која го одделува секој пар гени, освен 14 кб оддалеченост на уникатна секвенца пред 2ДЛ4.

11.3.5. Потребно за работа

За генотипизирање на КИР полиморфизмот неопходни се:

- Пластичен носач од 96 ведренца исполнет со лиофилизирани прајмери.
- 150 мкЛ пуфер за ПВР.
- Затворачи за пластичниот носач.
- Шеми за толкување.
- Так ДНК полимераза.
- Стерилна вода.
- Микропипетори и пластични продолжетоци.
- Топлотен циклер (сајклер) способен да носи 96 ведренца.
- ТБЕ пуфер за електрофореза.
- Агароза.
- Етидиум бромид.
- Апарат за електрофореза.
- Примерок од ДНК.

11.3.6. Услови за топлотно циклирање

Топлотното циклирање се врши според долната шема:

- 1. Стапка 1 мин на 95°Ц
- 2. Стапка 30 циклуси 94°Ц 20 секунди
  63°Ц 20 секунди
  72°Ц 90 секунди
- Чување 4°Ц дефинирано време

11.3.7. Протокол за работа

Методата се изведува со мешање на пуферот со примероците од човечка ДНК и Так ДНК полимераза, распоредување во 96 ведренца, затворање и топлотно циклирање.

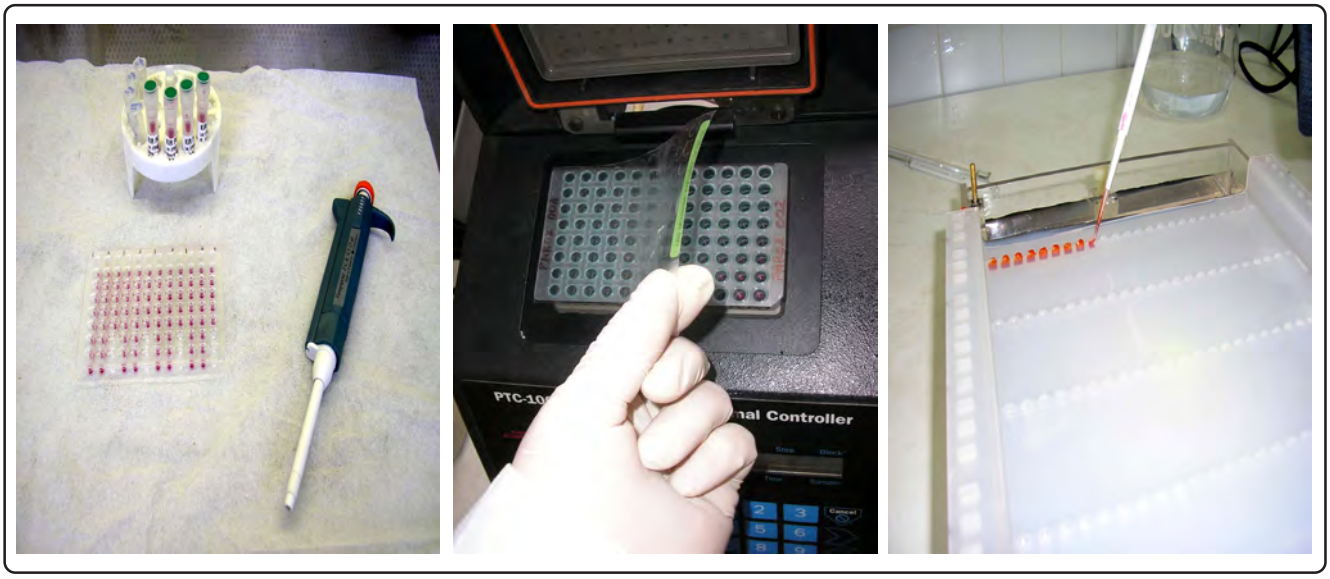
ПВР пуферот е сместен во посебна епруветка, и секоја епруветка одговара на еден испитуван примерок (една човечка ДНК). ПВР пуферот се чува замрзнат. Пред самата работа го оставаме 10 минути на собна температура. Одкога ќе се одмрзне пуферот, додаваме 81 мкЛ вода од ампула и 2.4 мкЛ Так ДНК полимераза. Епруветката ја мешаме или ја ставаме во мала центрифуга 1-2 минути. Ја отвораме термалната плочка и почнуваме со апликација. Од смешата вадиме 8 мкЛ и ги аплицираме како негативна контрола во последното веренце, која ни служи за проверка од контаминацијата. Потоа пипетираме 4 мкЛ геномска ДНК и ја аплицираме во епруветката, по што повторно кратко мешаме или ја ставаме во мала центрифуга 1-2 минути. Од смешата земаме по 8 мкЛ и ставаме во секое ведренце по вертикален редослед.

По завршувањето, ја ставаме термалната плочка во топлотниот циклер (сајклер), ја затвораме со пластичен покривач и врз неа ја поставуваме металната плочка која ни го осигурува потребниот трансфер на топлина. По завршетокот на циклирањето, се пристапува кон гел- електрофореза. Припремаме 2% агарозен гел, во кој додаваме етидиум бромид и во него го аплицираме ПВР продуктот. Пипетираме по 8 мкЛ од секое ведренце, го аплицираме во бунарчињата на агарозниот гел. Во последното бунарче аплицираме 5 мкЛ скала од ДНК фрагменти со големина од 50 до 500 базни пара. Го вклучуваме апаратот и го подесуваме програмот на 30 мин на 170V, 400mA и 100W. По завршената електрофореза, гелот во кој има етидиум бромид се осветлува со ултравиолетно светло и се фотографира (Слика 11.7). Резултатите од фотографијата се интерпретираат со специјални шеми приготвени за КИР полиморфизам.

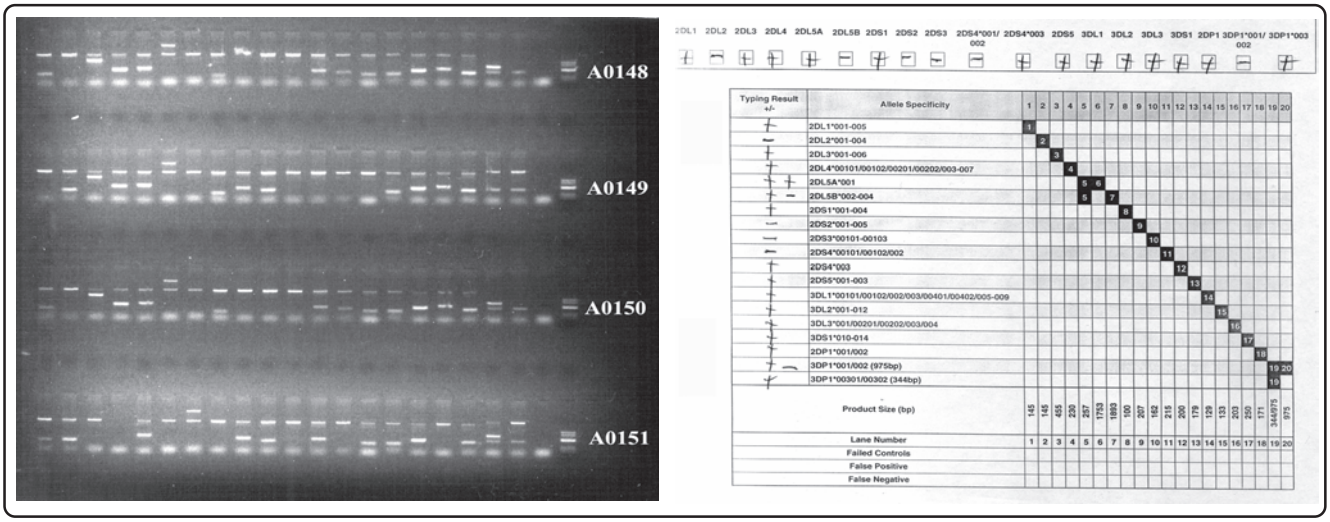
11.3.8. Толкување на резултатите

Резултатите од испитаникот се анализираат од фотографијата која се лепи на специјален формулар. Се анализира едниот примерок од фотографијата на следниов начин (Слика 11.8 и Слика 11.14):

1. Секоја линија треба да има контролна линија



Слика 11.7: Потребно за поставување полиморфизам на КИР (лево); полимеразно верижна реакција на КИР (средина); електрофореза на четири примероци од полиморфизам на КИР (десно).



Слика 11.8: Фотографија од електрофореза на КИР генотипизирање (лево), внесување и толкување на резултатите од испитаникот А0148 (десно).

освен линијата 21 која содржи слепа проба.

2. Се идентифицираат позитивните линии од специфичниот ампликон со плус во специјалниот формулар во колоната "Резултат од типизирање". Таму каде што нема специфични ампликони се означуваат со минус.

3. Со фломастер се осветлува секоја позитивна линија (колона) со вертикална линија од горе кон долу.

4. Таму каде што се добиени позитивни линии (резултати) се пренесуваат во облик на плусеви и минуси во квадратите над резултатите.

11.4. Задачи

11.4.1. Определи го цитокинскиот полиморфизам од дадена фотографија

11.4.1.1. Определување цитокински полиморфизми со специјален формулар

Студентите добиваат една фотографија од цитокински полиморфизам и ги толкуваат резултатите. Внатрешниот стандард во првите 26 ведренца (од 1А до 4В) е амплифициран ген од Ц-реактивен протеин со големина од 440 бп (најдесно на Слика 11.9), додека во следните 22 ведренца (од 4С до 6Н) внатрешен стандард е бета глобинскиот ген со големина од 89 бп (најлево на Слика 11.9).

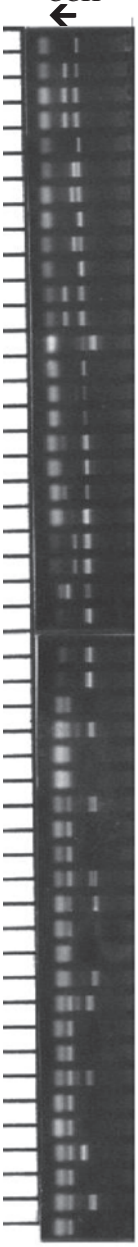
Најпрвин, во колоната "Позитивна линија" таму каде што има специфичен ампликон (уште една дополнителна линија на електрофорезата, покрај внатрешниот стандард) се означува со "+". Таму каде што нема специфична амплификација се внесува "-".

Следниот чекор е толкување на резултатите кои што сме ги внесле. Во цитокинските полиморфизми само со две линии, толкувањето е најлесно. Ако има специфичен ампликон само во една линија, тогаш се работи за хомозигот, додека ако има во двете линии, се означува како хетерозигот.

На пример, ведренцето 1 е специфично за ИЛ-1алфа/-889Т, додека ведренцето 2 е специфично за ИЛ-1алфа/-889С. Според тоа, позитивен ампликон само во првата линија дава резултат ИЛ-1алфа/-889ТТ (хомозигот за Т), само во втората линија дава резултат ИЛ-1алфа/-889СС (хомозигот за С), а присуството на линии и во линијата 1 и во линијата 2 дава резултат ИЛ-1алфа/-889ТС (хетерозигот). На овој начин можат да се протолкуваат најголемиот број цитокински полиморфизми.

Меѓутоа, за толкување на полиморфизмите на ТГФбета1, ТНФалфа, ИЛ-10 и некои други, неопходно е да се консултираат дополнителни табели за да можат да се протолкуваат резултатите.

Ако сме добиле специфичен ампликон само во 17 линија,



Бунарче	Цитокин	Специфичен алел	Бр. на линија	Специфичен амплификат (бп)	Внатрешна контрола (бп)	Примерок број: Позитивна линија	Дата: Резултат
1A,7A	IL 1α	–889 T	1	220 bp	440 bp		
1B,7B		–889 C	2	220 bp	440 bp		IL 1α хаплотип
1C,7C	IL 1β	–511 C	3	215 bp	440 bp		
1D,7D		–511 T	4	215 bp	440 bp		-511
1E,7E		+3962 T	5	336 bp	440 bp		+3962
1F,7F		+3962 C	6	336 bp	440 bp		IL 1β хаплотип
1G,7G	IL 1R	pst1 1970 C	7	288 bp	440 bp		
1H,7H		pst1 1970 T	8	288 bp	440 bp		IL 1R хаплотип
2A,8A	IL 1RA	mspa1 11100 T	9	297 bp	440 bp		
2B,8B		mspa1 11100 C	10	297 bp	440 bp		IL 1RA хаплотип
2C,8C	IL 4Rα	+1902 G	11	143 bp	440 bp		
2D,8D		+1902 A	12	143 bp	440 bp		IL 4Rα хаплотип
2E,8E	IL 12	–1188 C	13	802 bp	440 bp		
2F,8F		–1188 A	14	802 bp	440 bp		IL 12 хаплотип
2G,8G	γ IFN	UTR 5644 A	15	277 bp	440 bp		
2H,8H		UTR 5644 T	16	277 bp	440 bp		γIFN хаплотип
3A,9A	TGFβ1	cdn 10 C; cdn 25 G	17	80 bp	440 bp		
3B,9B		cdn 10 C; cdn 25 C	18	80 bp	440 bp		
3C,9C		cdn 10 T; cdn 25 G	19	80 bp	440 bp		10
3D,9D		cdn 10 T; cdn 25 C	20	80 bp	440 bp		25
3E,9E		cdn 10 C	21	195 bp	440 bp		
3F,9F		cdn 10 T	22	195 bp	440 bp		TGFβ1 хаплотип
3G,9G	TNFα	–308 G; -238 G	23	110 bp	440 bp		
3H,9H		–308 A; -238 G	24	110 bp	440 bp		-308
4A,10A		–308 G; -238 A	25	110 bp	440 bp		-238
4B,10B		–308 A; -238 A	26	110 bp	440 bp		TNFα хаплотип
4C,10C	IL 2	–330 T; +166 G	27	562 bp	89 bp		
4D,10D		–330 G; +166 G	28	564 bp	89 bp		-330
4E,10E		–330 G; +166 T	29	569 bp	89 bp		+166
4F,10F		–330 T; +166 T	30	569 bp	89 bp		IL 2 хаплотип
4G,10G	IL 4	–1098 T; -590 T	31	557 bp	89 bp		
4H,10H		–1098 T; -590 C	32	557 bp	89 bp		
5A,11A		-1098 G; -590 T	33	557 bp	89 bp		-1098
5B,11B		- 1098 G; -590 C	34	557 bp	89 bp		-590
5C,11C		-590 T; -33 T	35	610 bp	89 bp		-33
5D,11D		-590 T; -33 C	36	610 bp	89 bp		
5E,11E		-590 C; -33 T	37	610 bp	89 bp		
5F,11F		-590 C; -33 C	38	610 bp	89 bp		IL 4 хаплотип
5G,11G	IL 6	–174 G; nt565 G	39	427 bp	89 bp		
5H,11H		–174 C; nt565 G	40	426 bp	89 bp		-174
6A,12A		–174 G; nt565 A	41	428 bp	89 bp		nt565
6B,12B		–174 C; nt565 A	42	428 bp	89 bp		IL 6 хаплотип
6C,12C	IL 10	–1082 G; -819 C	43	305 bp	89 bp		
6D,12D		–1082 G; -592 C	44	530 bp	89 bp		-1082
6E,12E		–1082 A; -819 C	45	305 bp	89 bp		-819
6F,12F		–1082 A; s-819 T	46	305 bp	89 bp		-592
6G,12G		–1082 A; -592 C	47	530 bp	89 bp		
6H,12H		-1082 A; -592 A	48	530 bp	89 bp		IL 10 хаплотип

Слика 11.9: Фотографија од електрофореза на цитокински полиморфизам (лево) и формулар за анализа на цитокинскиот полиморфизам (десно).

тогаш се работи за ТГФбета1/CG, ако сме добиле специфичен ампликон само во 18 линија се работи за ТГФбета1/CC, само во 19 линија за ТГФбета1/TG. Специфичен ампликон во 21 линија дава ТГФбета1/CG/CC хетрозигот (Слика 11.10).

Специфичен ампликон само во линијата 23 дава резултат ТНФалфа/GG (хомозигот заGG), само во 24 линија дава ТНФалфа/AG (хомозигот само за AG), само во 25 линија дава ТНФалфа/GA (Слика 11.11).

Присуството на специфични ампликони во линиите 43 и 44 даваат резултат ИЛ-10/GCC, во линиите 45 и 47 даваат полиморфизам ИЛ-10/ACC, додека во линиите

Бр. на линија	TGFβ1 смеша	Полиморфизам во кодон 10	25	CG	CC	TG	TC
17	*cdn 10 C; cdn 25 G*	C	G	■	-	-	-
18	*cdn 10 C; cdn 25 C*	C	C	-	■	-	-
19	*cdn 10 T; cdn 25 G*	T	G	-	-	■	-
20	*cdn 10 T; cdn 25 C*	T	C	-	-	-	■
21	*cdn 10 C*	C	*	■	■	-	-
22	*cdn 10 T*	T	*	-	-	■	■
	Високи (**В**), Средни (**С**) или Ниски (**Н**) создавачи			**С**	**Н**	**В**	С?

Слика 11.10: Очекувани реакции за сите можни хаплотипови на TGFβ1. Оние хаплотипови кои се среќнуваат кај белото население се болдирани.

46 и 48 даваат полиморфизам ИЛ-10/АТА (Слика 11.12). Другите полиморфизми на ИЛ-10 многу поретко се наоѓаат.

Бр. на линија	TNFα смеша	Полиморфизам на позиција -308	-238	GG	AG	GA	AA
23	*–308 G; -238 G*	G	G	■	-	-	-
24	*–308 A; -238 G*	A	G	-	■	-	-
25	*–308 G; -238 A*	G	A	-	-	■	-
26	*–308 A; -238 A*	A	A	-	-	-	■
	Високи (**В**), Средни (**С**) или Ниски (**Н**) создавачи			**Н**	**В**	**Н**	В

Слика 11.11: Очекувани реакции за сите можни хаплотипови на TNFα. Оние хаплотипови кои досега се откриени кај белото население се болдирани.

11.4.1.2. Забелешки

Дополнителнии асоцијации во врска со нивото на создавање:

1. ИЛ4 Ралфа: +1092 G/G или G/A = зголемен ризик за појава на отфрлање.
2. ИЛ6: -174 G/G = висок, G/C = среден, C/C = низок создавач.
3. ИЛ2: -330 G/G = висок, T/T = низок, T/G = низок.

Бр. на линија	IL 10 смеша	Полиморфизам на позиција -1082	-819	-592	GCC	ACC	ATA	GCA	GTA	GTC	ACA	ATC
43	*–1082 G; -819 C*	G	C	*	■	-	-	■				
44	*–1082 G; -592 C*	G	*	C	■	-	-			■		
45	*–1082 A; -819 C*	A	C	*	-	■	-				■	
46	*–1082 A; -819 T*	A	T	*	-	-	■					■
47	*–1082 A; -592 C*	A	*	C	-	■	-					
48	*-1082 A; -592 A*	A	*	A	-	-	■				■	
	Високи (В), Средни (С) или Ниски (Н) создавачи				**В**	**С**	**Н**	**В?**	**В?**	**В?**	?	?

Слика 11.12: Очекувани реакции за сите можни хаплотипови на IL10. Оние хаплотипови кои досега се откриени кај белото население се болдирани.

Слабо позитивни резултати

Линија 1
Линија 2
Линија 3

Слаби лажно позитивни резултати (несоодветни базни парови)

Линија 17 приближно 200 и 600 базни парови
Линија 18 приближно 200 и 600 базни парови
Линија 39 приближно 200 базни парови

11.4.2. Определи го полиморфизмот на КИР рецептори од дадена фотографија

Студентите добиваат фотографија од електрофореза на полиморфизмот за КИР и од неа вршат анализа на резултатите.

Најпрвин се залепува фотографијата на Слика 11.13 и се означува лабораторискиот број. Од анализата на внатрешните контроли и специфичните ампликони можно е да се определи полиморфизмот на КИР. За полиморфизмот на КИР се користи внатрешна контрола која дава ампликон на околу 800 бп за КИР линиите од 1 до 18. За линиите 19 и 20 се користи внатрешна контрола со ампликон од околу 100 бп. Линијата 21 содржи слепа проба (нема специфичен ампликон), а линијата 22 содржи скала од познати фрагменти (ладер) (Слика 11.14, Слика 11.15).

Лабораториски број КИР: _____

Слика 11.13: Фотографија од гел електрофореза на полиморфизам на КИР.

Во формуларот на Слика 11.14, во првата колона "Резултати од типизирање", се внесуваат ознаки плус, ако има специфичен ампликон и со минус, ако нема специфичен ампликон. Дополнително (или повнимателно) толкување треба да се направи за линиите 5,6 и 7, како и за линиите 19 и 20 според описот на сликата 11.14.

Се повлекува хоризонтална линија од местото каде

Резултати од типизирањето (Проверка на присутните гени):

2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4* 001/002	2DS4* 003	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	2DP1	3DP1* 001/002	3DP1* 003
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Резултат од типизирање (+/-)	Алелска специфичност	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2DL1*001-005	1																			
	2DL2*001-004		2																		
	2DL3*001-006			3																	
	2DL4*00101/00102/00202/003-007				4																
	2DL5A*001					5	6														
	2DL5B*002-004					5		7													
	2DS1*001-004								8												
	2DS2*001-005									9											
	2DS3*00101-00103										10										
	2DS4*00101/00102/002											11									
	2DS4*004												12								
	2DS5*001-003													13							
	3DL1*00101/00102/002/003/00401/00402/005-009														14						
	3DL2*001-012															15					
	3DL3*001/00201/00202/003/004																16				
	3DS1*010-014																	17			
	2DP1*001/002																		18		
	3DP1*001/002 (975 bp)																			19	20
	3DP1*00301/00302 (344 bp)																			19	
Големина на продуктот (бп)		145	145	455	230	257	1753	1893	100	207	162	215	200	179	129	133	203	250	171	344/975	975
Линија број		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Неприфатливи контроли																					
Лажно позитивни																					
Лажно негативни																					

Слика 11.14: Формулар за анализа на гел електрофореза за полиморфизам на КИР.

што е добиен специфичн ампликон и се идентифицира полиморфизмот на КИР од втората колона на Слика 11.14. Добиените резултати се внесуваат во облик на плус или минус во квадратчињата предвидени за генотипот на КИР (Слика 11.15). Добиенитерезултати се пренесуваат на специјален формулар за издавање резултат, каде што плусевите се прикажуваат како број еден (1), а негативните како нула (0). Во коментарот може, но не мора, да се даде подетален опис кои хаплотипови се добиени и дали доминираат инхибиторни или стимулаторни КИР.



Слика 11.15: Распоред на внатрешните контроли (бели линии) и специфични ампликони (црни линии) од електрофорезата за полиморфизам на КИР.

Дата/Date

РЕЗУЛТАТИ ОД КИР-ДНК ТИПИЗИРАЊЕ / RESULTS OF KIR-DNA TYPING

Име и презиме / Name and surname	
Матичен број / ID number	
Број на здравствена легитимација / Health insurance number	
Упатен од / Requested by	
Дијагноза / Diagnosis	
Број на пациент / Patient No.	

Типизирање КИР (ССП метод) / KIR typing (SSP method)

КИР алели / KIR Allele	Алелски резултат / Allele Result	КИР алели / KIR Allele	Алелски резултат / Allele Result
KIR3DL3		KIR3DS1	
KIR2DS2		KIR2DL5A	
KIR2DL2		KIR2DL5B	
KIR2DL3		KIR2DS3	
KIR2DP1		KIR2DS5	
KIR2DL1		KIR2DS1	
KIR3DP1*003		KIR2DS4*001/002	
KIR3DP1*001/002		KIR2DS4*003	
KIR2DL4		KIR3DL2	
KIR3DL1			

Коментар / Comment

Слика 11.16: Формулар за внесување резултати од полиморфизам на КИР.

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

ВЕЖБА 12: ОПРЕДЕЛУВАЊЕ МУТАЦИИ СО МОЛЕКУЛСКИ МЕТОДИ

12.1. Вовед

Што е мутација? На ова прашање е многу тешко да се одговори. Во 1994 Брej (Bray) се обидел да даде некакви правила како да се разликува мутација од полиморфизам велејќи дека *„било која мутација мора да покаже функционални последици за да се елиминира можноста од полиморфизам"*. Најпрвин треба да се прави разлика помеѓу нарушување на фенотипскиот ефект и нарушувања кои што се „прикриени" („silent").

Прикриени нарушувања се:

- Нарушувања кои не ја менуваат аминокиселинската секвенца на определен протеин, на пример кодоните CGC, CGA и AGG во мРНК сите три го кодираат аргининот како аминокиселина која треба да се вгради во транслацијата. Промена во кодонот може да предизвика нестабилност на мРНК.
- Нарушувања кои не го менуваат прекројувањето на мРНК.
- Нарушувања кои ја менуваат аминокиселинската секвенца, но не на таков начин што ја менува функцијата на протеинот, на пример, промените се надвор од активните места на протеинот и не ја менуваат тридимензионалната структура на протеинот на таков начин што му ја менува функционалноста.

Некои од мутациите кои ги нарушуваат фенотиписките ефекти се:

- ***Нонсенс мутации*** - точкести мутации кои го менуваат кодонот кон прекинувачкиот (стоп) кодон што предизвикува предвремено завршување на полипептидната верига во најчесто нефункционален протеин.
- ***Миссенс мутации*** - точкести мутации кои предизвикуваат замена на аминокиселина со најчест губиток на протеинската функција.
- ***Делеции (отсечувања)*** - кои го скусуваат генскиот продукт, што силно ја нарушува протеинската функција.
- ***Инсерции (вметнувања), дупликации (удвојувања)*** кои го продолжуваат генскиот продукт, што силно ја нарушува протеинската функција.
- ***Други мутации*** кои можат да ја нарушат функцијата на промотерот, генската структура и процесирањето на РНК.

Брej сугерира дека треба да се исполнат следниве четири критериуми за да се разликува мутација од полиморфизам:

1. Во фамилија, мутацијата е фенотипска, само во оштетените (хомозиготни) членови, но не и во другите неоштетени (хетерозиготни) членови од фамилијата. *Забелешка: Ова се однесува само за автозомните рецесивни заболувања.*

2. За неоштетените, несродни лица фреквенцијата е помала од 1%.

3. За оштетената аминокиселина се знае дека е еволутивно конзервирана во видот (специесот).

4. "Постои слична мутација во хомологниот протеин и е докажано дека таа создава фенотип".

Мутациите можат да се категоризираат како:

- ***Зародишни или наследни мутации,*** кои се наследуваат од генерација во генерација и ги има во сите јадрени клетки. Овие мутации најчесто се анализираат со земање крв, но можат да се користат и неинвазивни методи за земање соодветни ткивни

примероци.

- ***Соматски мутации,*** кои се јавуваат во соматските клетки за време на нивниот живот и се присутни во нив, на пример во туморските клетки. Овие мутации мора да се анализираат со употреба на заболените (оштетените) клетки.

Било која дефиниција да се употреби, ниедна од нив нема да направи 100% точност, туку секогаш ќе постојат препокривања (сиви подрачја) околу дефиницијата за мутација.

12.2. Методи за откривање мутаци

Постои мноштво методологии за откривање мутации. Кога се прави избор кои методи да се користат, мора да се земат предвид видот на лабораторијата, потребниот број на анализи за откривање и кои се целите за откривањето мутации. Најзначајното прашање на кое треба да одговориме е: *Дали ние бараме позната или непозната мутација?*

За откривање на познати мутации во ДНК постојат повеќе методи, како на пример алел специфична амплификација/хибридизација (ASA/H), олигонуклеотидна метода за лигација (OLA), минисеквенционирање и други. Заедничка особина на сите овие методи е што тие само ги откриваат познатите мутации, но мутациите надвор од тие подрачја остануваат неоткриени.

Доколку местото и природата на мутацијата не се познати, тогаш мора да се земат предвид следниве услови (Табела 12.1).

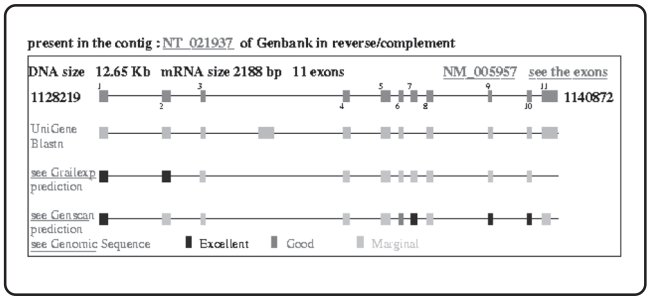
Табела 12.1: Методи за откривање непознати мутации на различни нивоа.

Ниво на информација	Потребна информација	Метод
Просејување (screening)	Има или нема мутација?	SSCP (Single strand conformational polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
Скенирање	Колку и каде се локализирани?	EMC (Enzymatic mismatch cleavage), CCM (Chemical cleavage by mismatch)
Идентификација	Кои се мутациите?	Секвенционирање

12.3. Откривање познати мутации

12.3.1. Откривање мутации на МТХФР (Methylentetrahydrofolate reductase)

Генот за MTHFR е наоѓа во првиот хромозом на 1p36.3 позицијата и се состои од 11 егзони (Слика 12.1). Ензимот MTHFR учествува во една од двете патеки во метаболизмот на хомоцистеин, каде што ја катализира реакцијата на реметилација на хомоцистеинот во метионин.



Слика 12.1: Локација (1p36.3) и егзонска структура (големина на ДНК = 12.65 Кб, големина на иРНК=2188 би, 11 егзони) на MTHFR.

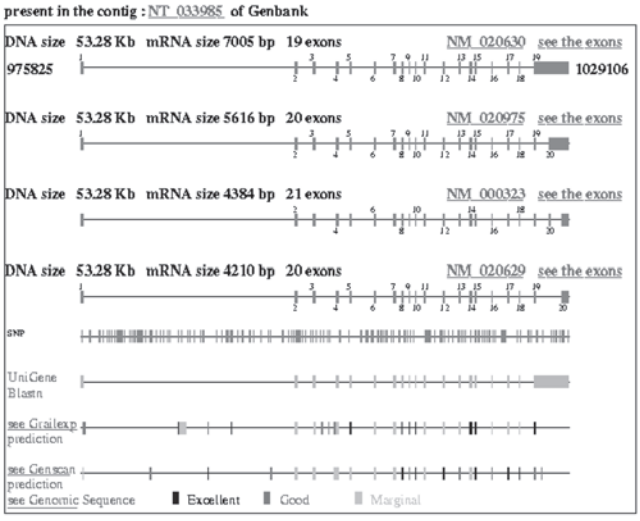
Полиморфизмите на MTHFR генот корелираат со особеностите на термолабилниот MTHFR протеин. Топлотно осетливата варијанта на ензимот има само 50% од активноста на нормалниот ензим. Мутација одговорна за оваа промена е замена на C (цитозин) со T (тимидин) на нуклеотидот 677 во кодирачката секвенца која го претвора аланинскиот во валински остаток. Нивото на хомоцистеин во плазма кај лица хомозиготни за оваа мутација е значајно повисоко отколку кај другите.

Мутацијата на MTHFR-C677T е многу честа. Околу 40% од популацијата се хомозиготни за дивиот тип C677, 45% се хетерозиготни за двата алели C677 и T677 и околу 15% се хомозиготни носители за T677 мутираниот алел. Неколку независни испитувања покажале дека хомозиготниот мутиран генотип е независен ризичен фактор за коронарна артериска болест.

12.4. Откривање непознати мутации

12.4.1. Секвенционирање на *рет* прото-онкоген за анализа на мутации

Генот за *ret* прото-онкогенот се наоѓа на хромозомот 10q11.2 и е составен од 20 егзони (Слика 12.2). Тој го кодира рецепторот за тирозин киназа. Тој е утврден како кандидат ген за мултиплата ендокрина неоплазија тип 2ª (MEN2A) и 2B (MEN2B), за фамилијарниот медуларен тироиден карцином (FMTC), за спорадични случаи на медуларен тироиден карцином (MTC) и за феохромоцитом. Заро-дишните мутации се асоцирани со FMTC, додека соматските мутации се аосицирани со спорадични форми од тумори. Зародишните мутации кои укажуваат на појава на FMTC или MEN2 можат да се откријат со директно секвен-ционирање на *ret* прото-онкогенот во примероци од крв.



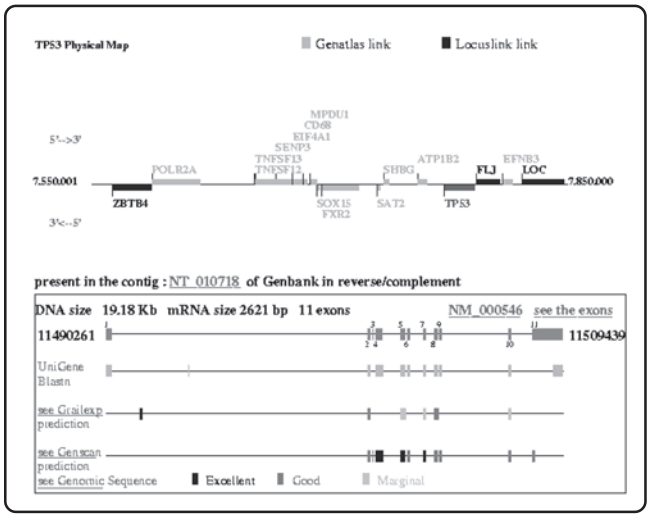
Слика 12.2: Локација на ген на ret прото-онкоген во 10q11.2 хромозом и структура на неговите 20 егзони.

Кај повеќе од 90% од случаите со MEN2A и повеќе од 85% од случаите со FMTC откриена е асоцијација со точкестите мутации во егзон 10 (на кодоните 609, 611, 618 и 620) или во егзонот 11 (кодон 634). Точкеста мутација на егзон 16 (кодон 918) е присутна во повеќе од 95% кај случаите со MEN2B. Поради тоа секвенционирањето на генот може да се искористи за рана дијагноза на MEN2 и FMTC, што овозможува ран профилактичен третман за превенција на метастази од овие заболувања.

12.4.2. Секвенционирање на *тп53* генот за анализа на мутации

Генот *tp53*, супресорен ген кој најчесто мутира кај определени видови карцином, ја контролира репарацијата на ДНК во клетките со одложување на репликацијата на ДНК се додека целосно не се завршат механизмите на репарација. Оттука, мутираниот п53 протеин може да ја наруши клеточната репарација до малфункција и потенцијално да доведе до карцином.

Генот за *tp53* се наоѓа на 17p13.1 хромозом, помеѓу гените ATP1B2 и FLJ и е составен е од 11 егзони (Слика 12.3).

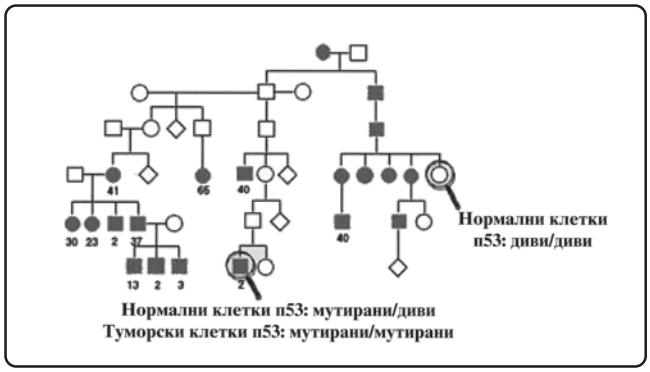


Слика 12.3: Физичка локација на ген на tp53 на 17 хромозом (17p13.1) и неговата структура од 11 егзони.

Генетската анализа на колоректалниот хромозом покажува голем процент на хетерозиготен губиток на краткиот крак од 17 хромозом, кој е носител на генот за *tp53*. Откриени се стотици точкести мутации на генот за *tp53*, и во голем процент тие се здружени со хетерозиготен губиток на краткиот крак од 17 хромозом.

Зародишна мутација на генот за *tp53* доведува до појава на Ли-Фраумени синдромот кој е асоциран со

широк спектар карциноми, како што се остеосаркоми, карциноми на дојка, саркоми на меки ткива и леукемија во многу млада возраст. Статистичката анализа предвидува дека 50% од лицата со мутација на *tp53* ќе развијат тумор пред 30тата година од животот, а 90% пред 70тата. Најдени се неколку фамилии со овој синдром (Слика 12.4).



Слика 12.4: Фамилијарно стебло на една фамилија со мутации на генот за tp53.

12.5. Задачи за студентот

12.5.1. Да се испитаат мутациите на гените поврзани со кардиоваскуларниот систем

12.5.1.1. Методологија

Постапката вклучува три фази: (1) ДНА изолација, (2) ПВР употребувајќи биотинилирани започнувачи (прајмери), (3) хибридизација на амплифицираните продукти на Тест траки кои содржат алел-специфични олигонуклеотидни проби нанесени како паралелни линии. Биотинилираните секвенци се одредуваат употребувајќи стрептавидин-алкална фосфатаза и обоен субстрат.

12.5.1.2. Потребни реагенси

ДНАТ-денатурирачки раствор содржи 1.6% NaOH, амплификациска смеша, пуфер за разредување на Так полимераза, конјугат кој содржи стрептавидин-алкална фосфатаза, раствор за плакнење Б содржи 0.05% NaN_3, раствор за обојување кој содржи нитро блу тетразолиум (НБТ) и 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфат (БХИФ).

12.5.1.3. Полимеразно верижна реакција (ПВР)

ПВР се одвива во две поделени реакции за еден примерок.

- Се припрема разредување 1:25 со крајна концентрација 0.2 Е/мкЛ од Так полимераза во пуфер за разредување на Так полимераза.
- Се припремаат за секој примерок што треба да се амплифицира по две ПВР реакциски смеши А и Б. Се стават примероците на мраз:

Реакциска смеша А
15 мкЛ Амплификациска смеша А
5 мкЛ разредување од Так полимераза
5 мкЛ ДНА примерок

Реакциска смеша Б
15 мкЛ Амплификациска смеша Б
5 мкЛ разредување од Так полимераза
5 мкЛ ДНА примерок

- Се стават реакциските примероци во термо-сајклер:
пред-ПВР на 94°Ц/2 мин.
денатурација на 94^{0}Ц/15 сек.
прилепување 58^{0}Ц/30 сек.
елонгацијана 72^{0}Ц/30 сек. (35 циклуси)
крајна елонгација на 72^{0}Ц/3 мин.
- Се чуваат амплифицираните примероци на ладно од 2-80°Ц до хибридизација.
- Се анализираат амплифицираните примероци на гел електрофореза (3% агарозен гел).

12.5.1.4. Хибридизација

Хибридизацијата се изведува на 45°Ц во водено купатило со мешање. Се подесува нивото на водата во воденото купатило да биде околу 1/2 од висината на кадичката за типизирање. Потоа се загрева воденото купатило на 45°Ц (± 0.5^{o}Ц) и се стават на предзагревање хибридизацискиот пуфер и растворот за плакнење А, на истата температура. Тест лентите, ДНАТ, конјугатот, растворот за плакнење Б и растворот за обојување се остават на собна температура.

- Се пипетира 20 мкЛ ДНАТ во еден крај на секој ред од кадичката за типизирање (еден ред за еден примерок).

- Се додава 10 мкЛ амплификационен примерок А во редовите со ДНАТ.

- Се додава 10 мкЛ амплификационен примерок Б во истите редови и се меша внимателно со пипета.

- Се остава 5 мин на собна температура.

- Се додава 1мЛ хибридизациски пуфер (предзагреан на 45°Ц) во секој ред од кадичката за типизирање.

- Се додаваат Тест лентите со чиста пинцета во секој ред од кадичката. Тие се обележуваат од надворешната страна за секој примерок.

-Се инкубира 30 мин. на 45°Ц во водено купатило со мешање (50 ввм).

-На крајот од инкубацијата се одстранува течноста со вакум аспиратор.

Плакнење (45°Ц; водено купатило со мешање).

- Се додава 1 мЛ раствор за плакнење А (предзагреан на 45°Ц). Се плакне за 10 сек. Се одстранува течноста со вакум аспиратор.

- Се додава 1 мЛ раствор за плакнење А (45°Ц).

- Се инкубира 15 мин на 45°Ц во водено купатило со мешање. Се одстранува течноста со вакум аспиратор.

- Се додава 1 мЛ раствор за плакнење А (45°Ц). Се инкубира 15 мин на 45°Ц во водено купатило со мешање. Се одстранува течноста со вакум аспиратор.

Обојување (на собна температура).

- Се додава 1 мЛ коњугат.

- Се инкубира 15 мин на собна температура со мешање (50 ввм). Се одстранува течноста со вакум аспиратор.

- Се додава 1 мЛ раствор за плакнење Б. Се плакне за 10 сек. Се одстранува течноста со вакум аспиратор.

- Се додава 1 мЛ Раствор за плакнење Б.

- Се инкубира 5 мин на собна температура со мешање. Се одстранува течноста со вакум аспиратор.

- Се додава 1 мЛ раствор за плакнење Б.

- Се инкубира 5 мин на собна температура со мешање (50 ввм). Се одстранува течноста со вакум аспиратор.

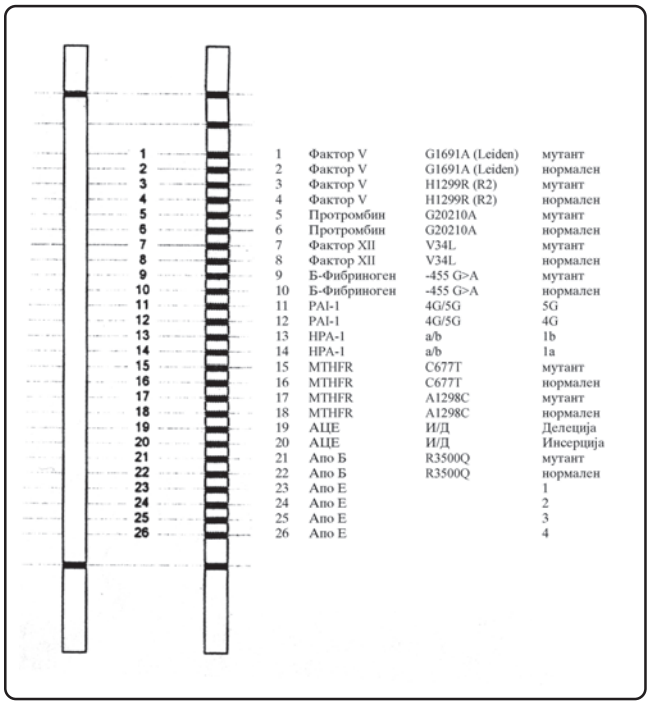
- Се додава 1 мЛ раствор за обојување.

- Се инкубира 15 мин на собна температура на темно со мешање (50 ввм).

- Се плакнат Тест лентите неколку пати со дестилирана вода и се оставаат на темно на впивателна хартија.

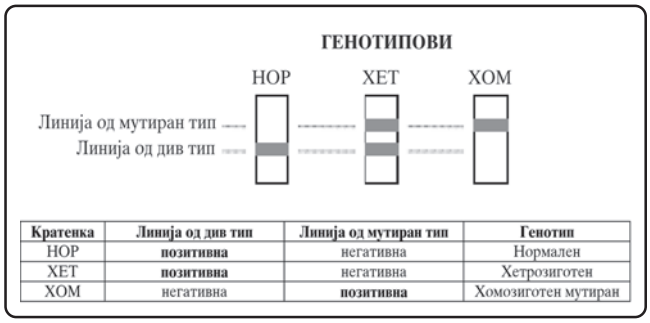
12.5.1.4. Толкување на резултатите

Анализа и интерпретација на резултат од испитување на мутации важни во генетски болести од кардиоваскуларниот систем се врши на следниов начин:
Се залепува лентата од резултатот во формуларот (Слика 12.5).



Слика 12.5: Формулар за внесување резултат од испитување мутации на КВС.

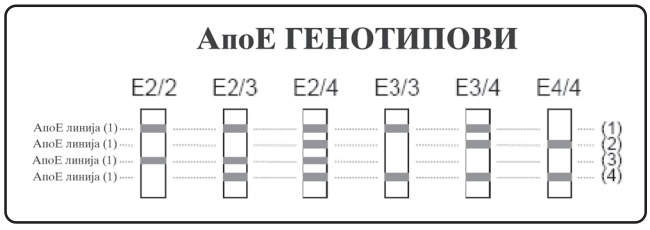
За секоја полиморфна позиција од гените на КВС (освен за АпоЕ) може да се добие еден од облиците: било нормален (НОР), било хетерозиготен (ХЕТ), било хомозиготен мутиран (ХОМ) генотип (Слика 12.6).
Од трите Апо Е изоформи можат да се добијат вкупно шест хомо и хетерозиготни Апо Е генотипови (Слика



Кратенка	Линија од див тип	Линија од мутиран тип	Генотип
НОР	**позитивна**	негативна	Нормален
ХЕТ	**позитивна**	негативна	Хетрозиготен
ХОМ	негативна	**позитивна**	Хомозиготен мутиран

Слика 12.6: Толкување резултат од испитување мутации на КВС (освен за Апо Е).

12.7).
Добиените резултати за секој ген се внесуваат во специјален формулар (Табела 12.2).



Слика 12.7: Толкување резултат од испитување полиморфизам на Апо Е.

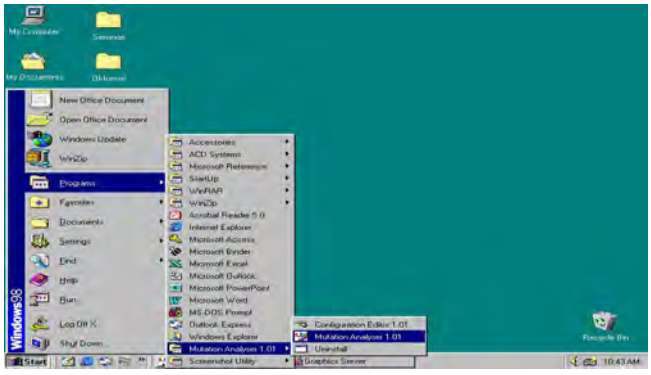
12.5.2. Да се анализираат секвенците од различни егзони на *ret* прото-онкогенот и *tp53* генот и да се откријат нивните мутации со софтверот Mutation Analyser

Благодарение на неговата висока осетливост и специфичност, во последниве години секвенционирањето на ДНК станува златен стандард во испитувањето на различни мутации. Компјутерскиот програм Mutation Analyser 1.01 овозможува анализа на секвенци, автоматско детектирање на специфични аберации во секвенци добиени од ALF express или слични автоматски секвенционери. Програмот може да открие неколку типови на отстапувања вклучувајќи замени на единечни бази, одделни инсерции или делеции, како и мешани инсерции или делеции. Како основа за споредба, софтверот користи нормална генска конфигурација достапна од интернет базирани бази на секвенци.

Табела 12.2: Внесување резултати од мутации на кардиоваскуларниот систем.

Број	Ген	Позитивни траки	Резултат (Генотип)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

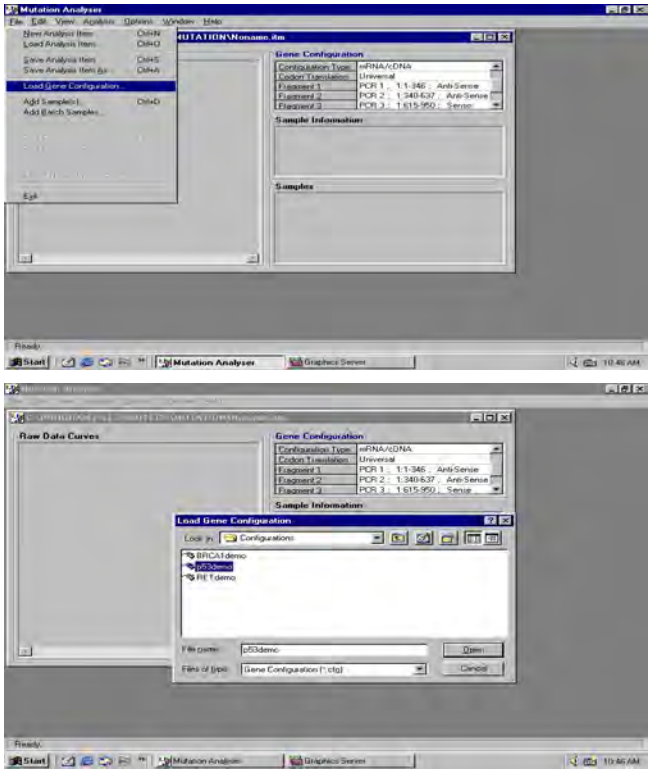
Апликацијата се стартува со двојно кликнување на нејзината икона од десктоп или со следење на патеката: **Programs > Mutation Analyzer 1.01 > Mutation Analyzer 1.01** (Слика 12.8). По пријавување на операторот (корисникот) чие име ќе биде вклучено во завршните извештаи, може да се продолжи со користење на програмот.



Слика 12.8: Почетниот екран за активирање на програмот за анализа на мутации.

Најпрво е потребно да се креира нова анализа и да се конфигурира генската секвенца на нормалниот ген т.е. да се одбере секвенцата која ќе ја користиме за споредба преку избирање на дијалогот: **File > Load Gene Configuration** (Слика 12.9). Потоа се одбира секвенцата од примерокот за испитување преку: **File > Add Sample.** Кога се додадени сите релевантни примероци за анализирање, се кликнува на копчето **Exit** за да се напушти тој прозорец.

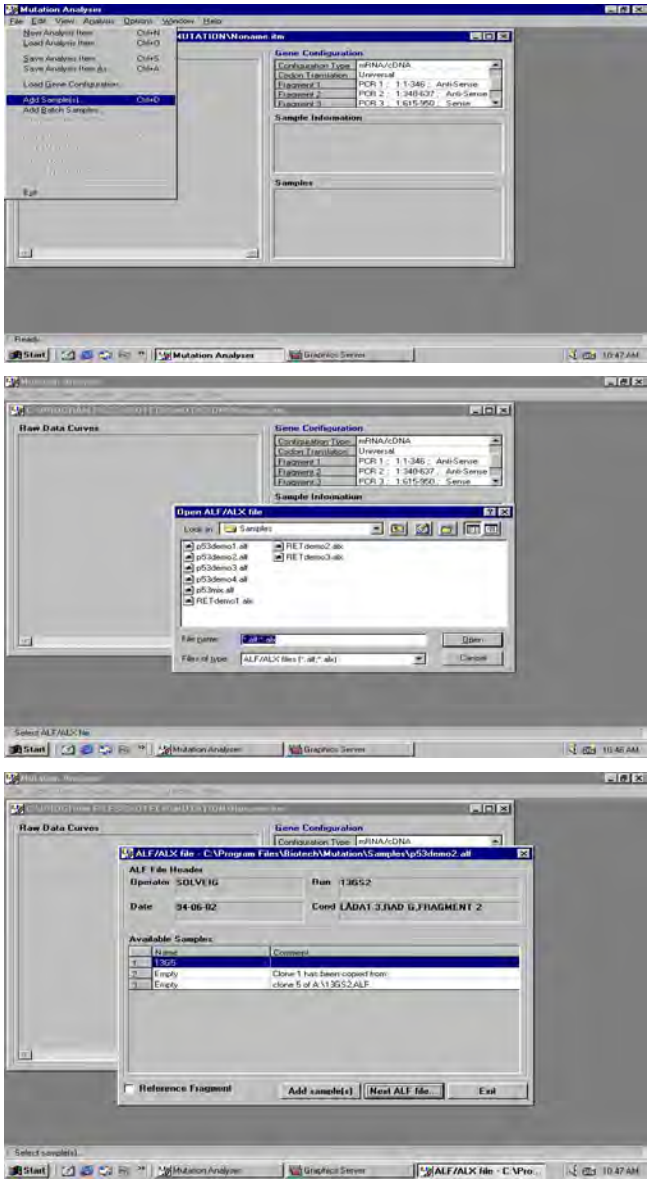
Пред да се продолжи со анализата, потребно е да се дефинираат опциите за пресметување на отста-



Слика 12.9: Одбирање ѓенска секвенца која ќе се користи за анализа (во случајов тр53).

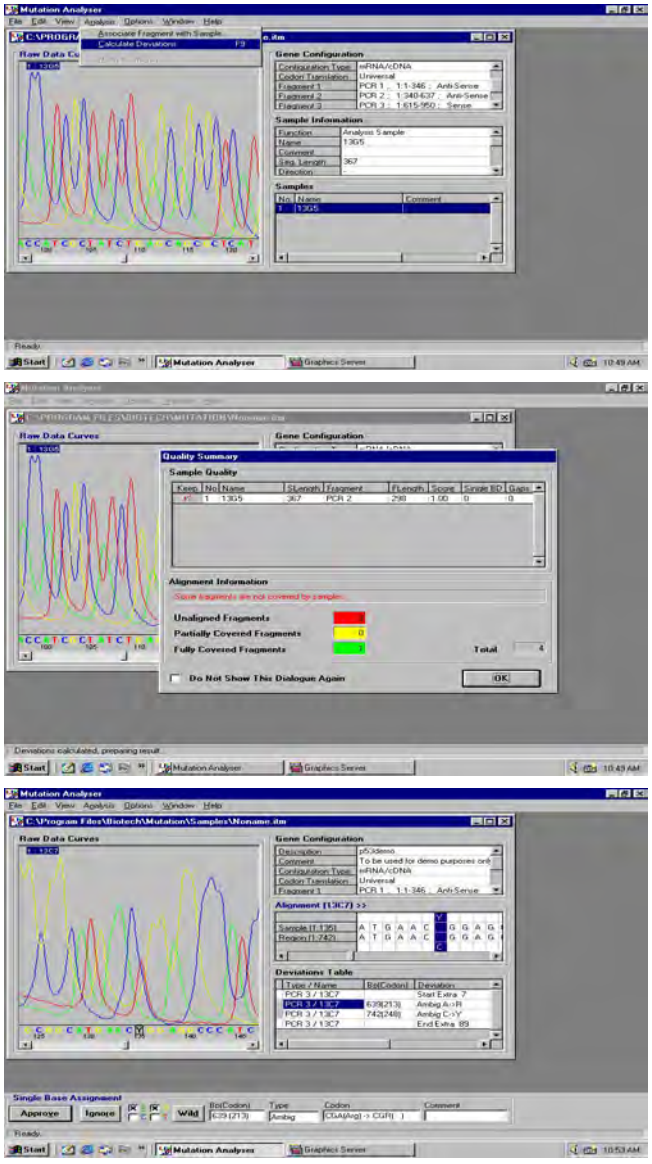
пувањата. Тоа се прави со избирање **Options > Deviation > Calculation Options** (Слика 12.10).

За анализирање на отстапувањата во одбраната секвенца се избира **Analysis > Calculate Deviations,** по што примероците кои биле вклучени во анализата автоматски се подредуваат и споредуваат со нормалната секвенца од анализираниот ген дефеинирана со конфигурацијата на генот. Автоматски се појавува дијалогот **Quality Summary** во кој се вклучени податоците за името на анализираниот примерок, големината на секвенцата, процентот на совпадливост со секвенцата за споредување, бројот и видот на отстапувања, како и евентуално присутни делови кои не одговараат на ниеден дел од нормалната секвенца. По клинкување на **OK**, се појавува прозорец во кој се прикажани резултатите од анализата групирани во неколку полиња, вклучувајќи табела на отстапувања **(Deviations Table)**, поле на подредување (**Alignment Field**), графички прикажани секвенци **(Raw Data Curves)** и поле за назначување на резултатот **(Assignment Bar)** (Слика 12.11).



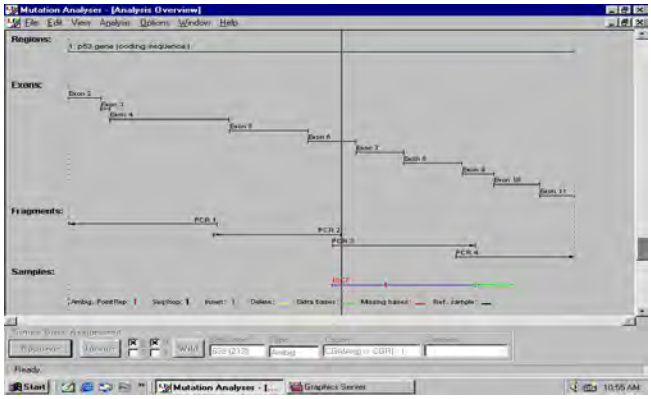
Слика 12.10: Внесување податоци од веќе обработена секвенца за анализа на мутации (во случајов тр53).

Бидејќи се работи за интерактивна анализа, операторот може според сопственото мислење да ја толкува анализираната секвенца и евентуално присутното отстапување. За секое од нив, корисникот може да назначи отстапување во поединечна база, инсерција, делеција или мешана инсерција/делеција. Отстапувањето може да се прифати/потврди со одбирање на **Approve** копчето, да се игнорира со одбирање на **Ignore** или отстапувањето може автоматски да биде сменето



Слика 12.11: Анализирање на внесенаӣа секвенца за неӣознаӣи муӣации (во случајов ӣӣ53).

во нормална секвенца со одбирање на копчето **Wild.** Увид во целата анализа попрегледно може да се добие со одбирање на **View > Analysis Overview,** по што се прикажува генската конфигурација на сите региони



Слика 12.12: Преӣледна анализа на муӣациӣе во секој еӣзон од ӣӣ53 ӣеноӣ.

заедно со аминокиселинската кодирачка секвенца. Отстапувањата се означени со вертикални линии, а нивниот вид може да се прочита во легенда (Слика 12.12).

Конечно, извештајот за анализата може да се испечати со избирање на **File > Print Report,** а вклучените опции во извештајот се избираат преку: **Options > Report Options.**

Добиените резултати од мутациите на рет прото-онкогенот се внесуваат во Табела 12.3, а резултатите од мутациите на тп53 се внесуваат на Табела 12.4.

Табела 12.3: Внесување резултат од анализата на отстапувања од нормалната секвенца за *Реӣ* прото-онкогенот.

Анализиран ген/егзон од *реӣ* прото-онкоген	Позиција бп (кодон)	Отстапување

Табела 12.4: Внесување резултат од анализата на отстапувања од нормалната секвенца за *ӣӣ53* генот.

Анализиран ген/егзон од *ӣӣ53* генот	Позиција бп (кодон)	Отстапување

Дата Студент Асистент

_____ _____ _____

БЛОК 5

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 13. ПОПУЛАЦИСКА ГЕНЕТИКА

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да пресметаат алелска фреквенција на ХЛА-ДРБ1 локусот.

ВЕЖБА 14. КВАНТИТАТИВНА ГЕНЕТИКА (ГЕНЕТСКА ЕПИДЕМИОЛОГИЈА)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- анализираат асоцијација на цитокински полиморфизам со бронхијална астма.

ВЕЖБА 15. ЕВОЛУЦИСКА ГЕНЕТИКА

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- пресметаат генетска оддалеченост на различни народи во ХЛА-ДРБ1 локусот.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	0.50 поени
ЗНАЕЊЕ	2.50 поени
ВКУПНО:	3.00 поени

ВЕЖБА 13: СОЗДАВАЊЕ РАЗЛИЧИЕ ВО ПОПУЛАЦИЈА (ПОПУЛАЦИСКА ГЕНЕТИКА)

13.1. Вовед

Еволуциските промени, кои се всушност механизми на создавање различие на животот на земјината топка, можат да се анализираат на два начини: 1) Еволуција на видовите во тек на геолошко време; или 2) Генетско различие на еден вид во тек на време (низ генерации). Овие две скали на еволуциски промени (создавање различие) често се означуваат со ***макро еволуција*** и ***микро еволуција***.

13.1.1. Зошто ни требаат модели за популации и за молекули?

Фреквенцијата на алелите се менува низ времето и просторот и претставува клуч со кој можеме да ги истражуваме еволуциските процеси. Со разбирање механизмите со кои "силите на еволуцијата" влијаат врз фреквенцијата на алелите, ние можеме да создадеме математички модели кои ќе ја претпостават реалноста. Овие модели ни се неопходни за да ги разбереме прецизните меѓувлијанија од тие "сили" и да овозможиме заклучоци за минатите процеси врз основа на модерното различие.

13.2. Харди Вајнбергова рамнотежа (ХВР)

Во 1908 година, независно еден од друг, Харди (G. H. Hardy) англиски математичар и Вајнберг (W. Weinberg) германски физичар, работеле врз математичката основа за популациска генетика. Нивната формула ја предвидувала очекуваната генотипска фреквенција со употреба на алелските фреквенции од диплоидна Менделова популација. Тие си поставувале прашања од типот: *Што ќе се случи со фреквенциите од алелите во популацијата со тек на време?* или *Дали очекувате дека алелите ќе исчезнат или ќе постанат пофреквентни со тек на време?*

Харди и Вајнберг покажале дека во многу голема популација и со случајно парење, алелските фреквенции остануваат непроменети (или во рамнотежа) со тек на време, се додека не интервенираат некои други фактори. Доколку фреквенциите на алелите **А** и **а** (од двоалелски локус) се **п** и **к**, тогаш (**п** + **к**) = 1. Тоа значи дека (**п** + **к**)^2 = 1 е исто така единица. Исто така е точно дека (**п** + **к**)^2 = **п**^{2} +2**пк** +**к**^{2} = 1. Во оваа формула **п**^{2} одговара на фреквенцијата на хомозиготниот генотип АА, **к**^{2} одговара на аа, а 2**пк** одговара на Аа. Бидејќи се АА, Аа и аа трите можни генотипа во двоалелскиот локус, сумата од нивните фреквенции ќе биде единица. Всушност, Харди-Вајнберговата формула покажува дека:

$$п^2 + 2пк + к^2 = 1, \text{ односно}$$

$$АА \quad Аа \quad аа$$

Доколку добиените фреквенции не покажуваат значајно отстапување од тие очекувани фреквенции, велиме дека таа популација се наоѓа во Харди-Вајнбергова рамнотежа (ХВР) или на англиски Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Доколку не е така, тогаш постои нарушување на поставените правила и популацијата не се наоѓа во ХВР. За да се провери ХВР се започнува со пресметување на **п** од фреквенцијата на очекуваните генотипи, се пресметува **к** како (1-**п**) и се пресметува очекуваната хетерозиготна фреквенција (2**пк**) и хомозиготната фреквенција за другиот алел (**к**^{2}). Доколку овие пресметани фреквенции не се

исти со добиените фреквенции, примерокот не се наоѓа во ХВР. Треба да се напомене дека оваа формула треба да се корегира за анализа на повеќе алелски обележувачи, бидејќи Хи-квадрат тестот не е соодветен за анализа на повеќекратни алели.

13.2.1. Претпоставки за Харди-Вајнбергова рамнотежа

За Харди-Вајнберговата рамнотежа потребни се следниве претпоставки:

1. Големината на популацијата е ефективно бесконечна;

2. Парењето во популацијата е случајно (најчесто отстапување настанува од роднинско вкрстување);

3. Машките и женските имаат иста алелска фреквенција;

4. Нема мутациски и миграциски дејства врз алелските фреквенции во популацијата;

5. Генотипот има еднаква можност, односно нема селекција.

Харди-Вајнберговиот закон сугерира дека се додека овие претпоставки се точни, алелските и генотипските фреквенции нема да се менуваат во популацијата во следните генерации. Затоа било кое отстапување од Харди-Вајнберговата рамнотежа може да укаже дека:

1. Мал примерок од популацијта доведува до случајни грешки во собирањето примероци и непредвидливи генотипски ферквенции (во реалната популација големината е секогаш конечна и фреквенцијата на алелот може да варира од генерација во генерација само поради случајни промени);

2. Селективно парење кое може да биде позитивно (зголемена хомозиготност) или негативно (зголемена хетерозиготност) или роднинско парење ја зголемува хомозиготноста во целиот геном без промени во алелските фреквенции. Парењето со избрани мажи исто така ја зголемува можноста од ретки алели и хетерозиготност за соодветниот алел (во реалноста случајното парење не се остварува секогаш);

3. Многу големиот степен мутации во една популација (типичен степен на мутации во една генерација изнесува помалку од 10^{-5}) или масивна миграција од генотипски различни популации влијае врз алелските фреквенции;

4. Селекција на еден или комбинација од генотипови (селекцијата може да биде негативна или позитивна). Друга причина може да биде нееднаков сооднос на преносот на алтернативни алели од родителите врз децата.

Во повеќето популации генетските испитувања (како што е пресметувањето на поврзана нерамнотежа) претпоставува Харди-Вајнбергова рамнотежа. Тоа значи дека генотипските веројатности се определуваат од алелските фреквенции и ништо не влијае врз нив. Ако ова не се исполни, мерењата можат да бидат неточни.

13.2.2. Импликации од Харди-Вајнберговата рамнотежа

Постојат неколку импликации од Харди-Вајнберговата рамнотежа:

1. Алелската фреквенција останува константна од генерација во генерација. Тоа значи дека наследните механизми сами за себе не ги менуваат алелските фреквенции.

2. Кога е еден алел редок, постојат многу повеќе хетерозиготи отколку хомозиготи за него. Оттука, ретките алели не е можно да се отстранат дури и ако постои селекција наспроти нивната хомозиготност.

3. За популација во ХВР, соодносот од хетерозиготи е максимален кога се алелските фреквенции еднакви (кога п = к = 0,50).

4. Примена на ХВР е кога фреквенциите на автозомните рецесивни заболувања (српеста анемија, наследна хемохроматоза, наследна надбубрежна хиперплазија) се познати во популацијата и ако се верува дека важи ХВР во таа популација, тогаш може да се пресмета фреквенцијата на генот за болеста.

Кога една популација се наоѓа во ХВР, тоа не мора да значи дека сите претпоставки се валидни, бидејќи може да има компензаторни сили. Слично на тоа, значајни отстапувања можат да настанат поради грешки во собирањето примероци (вклучувајќи го Валундовиот ефект), погрешна класификација на генотиповите, мерењето на два или повеќе одделни системи како еден систем, неможност да се откријат

ретките алели и вклучување на непостоечки алели. Организмите се предмет на мутации и на селективните сили или алелските фреквенции можат да бидат различни кај машките и кај женските. Во популацијата генските фреквенции константно се менуваат, а ефектите од овие процеси можат да се утврдат со користење на Харди-Вајнберговата рамнотежа како почетна стапка во истражувањата.

Најчесто отстапување од ХВР настанува поради грешки во генотипизирањето. Погрешното означување алели, особено со методот на ССП, може да настане поради алелскиот губиток (allelic droput) и да доведе до нарушување на ХВР. Поради тоа треба внимателно да се контролираат методите за генотипизирање. Ако методот за генотипизирање е добро контролиран, отстапувањето од ХВР може да биде реално во определена популација.

13.2.3. Некои концепти значајни за Харди-Вајнберговата рамнотежа

Валундов ефект: Смалување на добиената хетерозиготност (зголемена хомозиготност) поради собирање на различни субпопулации кои не се мешаат како заедничка целина за парење. Кога сите субпопулации имаат иста генска фреквенција, не постои варијација помеѓу субпопулациите и не постои Валундов ефект (односно Фст=0). ***Изолирано прекинување*** е феномен кога просечната хомозиготност привремено се зголемува кога субпопулацијата прави контакт и се пари (тоа е поради смалување на хетерозиготноста). Тоа е спротивно од Валундовиот ефект.

Ф статистика: Во популациската генетика Ф статистиката се употребува како фиксациски индекс, ако се зголемува фиксацијата постои зголемена хомозиготност поради родбински парења. Рајт (Wright) развил три фиксациски индекси за да ја испита подподелбата на популацијата: **Фис** (интериндивидуални), **Фст** (субпопулациски), и **Фит** (вкупно популациски).

Фис е мерка за веројатноста два алела од едно лице да се идентични со нивните претходници и се наречува коефициент на сродност (родбинство) (inbreeding coefficient = f). Вредност на Фис се движи помеѓу -1 и +1. Негативна вредност на Фис укажува на хетерозиготен вишок (несродност), а позитивните вредности укажуваат на хетерозиготен кусок (сродност) во споредба со очекувањата од ХВР.

Фст го мери ефектот на популациската поделба, што е редукција на хетерозиготноста во субпопулацијата поради генетско скршнување (genetic drift). Се наречува уште и како коанцестрален коефициент (coancestry coefficient = Θ) или фиксациски индекс. Фст е секогаш позитивен и се движи од ***0 = целосна измешаност*** (панмиксис) (нема подподелби, се случува случајно парење, нема генетска дивергенција во популацијата) и ***1 = целосна изолација*** (екстремна подподелба). Вредност на Фст до 0.05 укажува на незначајни генетски разлики, додека над 0.25 значи многу голема генетска диференцијација во анализираната популација. За човековите популации средната вредност за Фст од голем број на ДНК полиморфизми изнесува 0.139 (и 0.119 за неДНК полиморфизмите). Со употреба на Фст се добиваат помали разлики помеѓу популациите во континентите, отколку помеѓу континентите. Овие наоди се во согласност со изолацијата на примероците поради оддалеченоста. Фст може да се употреби и за пресметување на генскиот проток: 0.25(1-Фст)/Фст. Овој параметар може да се користи и како генетска мерка за дистанцата помеѓу две популации наместо фиксацискиот индекс помеѓу многу популации.

Фит ретко се користи. Тоа е целосен коефициент за сродност на едно лице релативно кон целата популација (Individual within the total population).

13.3. Откривање селекција со користење податоци од ДНК полиморфизам

Дизајнирани се неколку методи за користење на ДНК полиморфизмите за да се добијат податоци од минатите селекции во популацијата. Класичен пример е главниот ткивно совпадлив комплекс од гени и нивните алели. Овие податоци можат да се користат како показатели за некои форми балансирана (диверзифирачка) селекција. Ако има неутрален полиморфизам се очекуваат еден општ алел и неколку ретки алели. Голем број алели укажуваат на диверзифирачка селекција.

Најголемиот број тестови ја откриваат селекцијата со отфрлање на неутралната претпоставка. Најнапред е користен тестот на неутралност наречен Еванс-

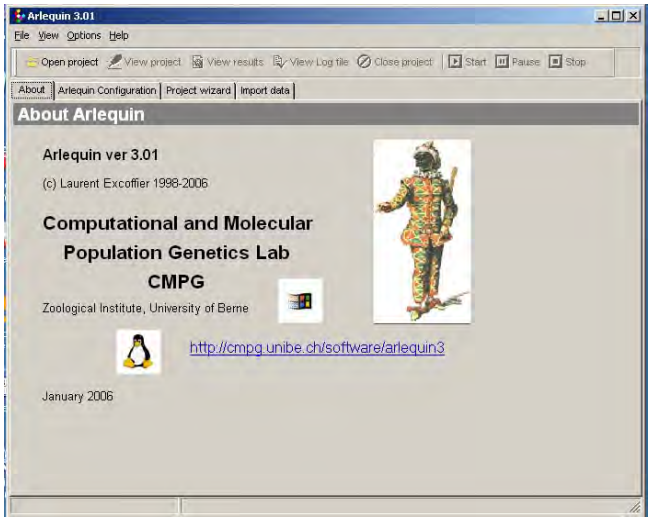
Ватерсон тест на хомозиготност, а подоцна се воведени тестовите на неутралност на Тајима Д (тета), како и тестовите на Фу и Ли (Д, Д* и Ф).

13.4. Задачи

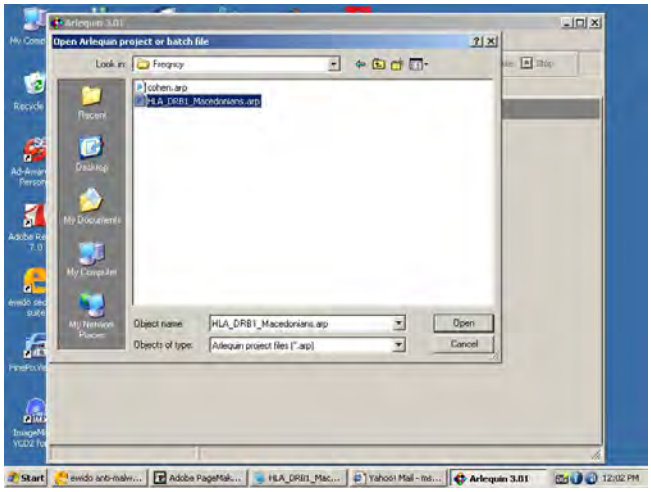
13.4.1. Да се направи анализа на алелската фреквенција на ХЛА-ДРБ1 локусот со компјутерскиот програм Arlequin

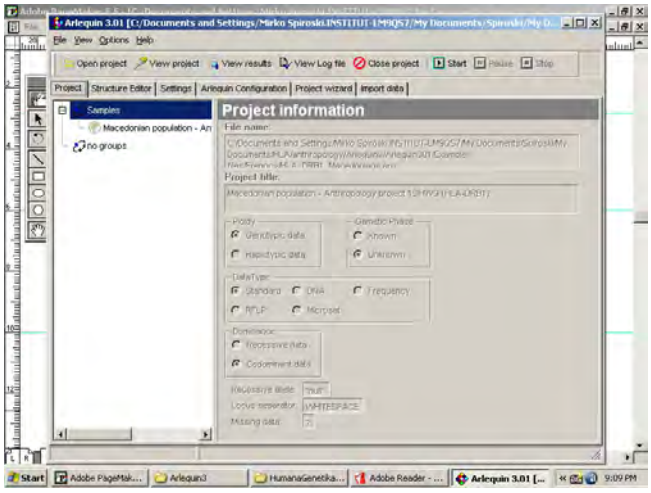
Компјутерскиот програм **Arlequin ver. 3.01** (2006) му овозможува на еден просечен корисник анализа на генетските и демографските особини на една или повеќе популации. Арлекин е француски превод на италијанскиот лик Арлекино кој има способност за различни особини прикажани низ неговиот костим во различни бои (Слика 13.1).

Арлекин може да користи повеќе видови податоци било во генотипски, било во хаплотипски облик. Основните видови генетски податоци можат да бидат прикажани како: ДНК секвенци, должински полиморфизам на рестрикциски фрагменти (ДПРФ), микросателити, стандардни податоци или како алелски



Слика 13.1: Активирање на компјутерскиот програм Arlequin.





Слика 13.2: Внесување податоци за анализа во компјутерскиот програм Arlequin (Отворање проект).

фреквенции. Деталите за можностите кои ги поседува овој компјутерски програм се надвор од потребите на еден студент кој треба да ја совлада популациската анализа како дел од предметот хумана генетика.

Во оваа вежба ќе бидат користени стандардни податоци од ХЛА-ДРБ1 алелите во македонската популација, добиени со секвенционирање на егзон 2 од ДРБ1 локусот, негова анализа со компјутерскиот програм Sequityper и дополнителни разграничувања со неколку методи за да се разрешат повеќе-значностите на добиените податоци. Податоците се приготвени во специјален фајл за користење во Арлекин, наречен HLA_DRB_Macedonians.arp кој се анализира. Во него се дефинирани параметри за анализа и нивното приго-

вување е надвор од потребата на студентите по медицина.

Најнапред се активира програмот со двојно кликнување на иконата со име **WinArl3**, при што се добива почетниот екран. Потоа се кликува на иконата **File > Open project** и се бара во директориумот **Example files > Freqncy > HLA_DRB1_Macedonians.arp**. Се кликнува на копчето **Open** и се добива екран во кој е прикажано дека проектот е отворен и може да продолжи натамошната работа со овој програм (Слика 13.2).

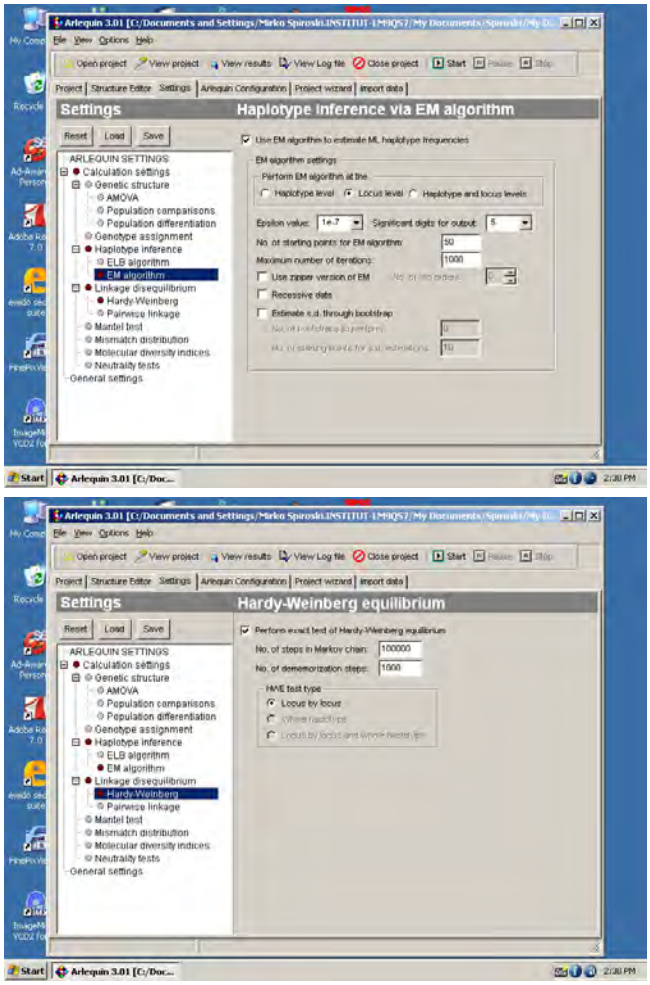
На копчето **Settings**, се бира **Haplotype inference** на левиот дел од екранот, потоа на **EM algorithm** и на десната страна од екранот се одбираат опциите **Use EM algorithm to estimate ML haplotype frequencies**, а во **EM algorithm settings** се избира опцијата **Perform EM algorthm at the Locus level**. Тоа значи дека сме избрале анализа на алелите од ХЛА-ДРБ1 локусот со методот на ЕМ алгоритам (Слика 13.3).

Следува избор на опцијата за пресметување на Харди-Вајн-берговата рамнотежа. Тоа се прави со избор на опцијата**Linkage disequilibrium** на левата страна од екранот, потоа избор на опцијата **Hardy-Weinberg,** а на десната страна се кликнува на опцијата **Perform exact test of Hardy-Weinberg equillibrium**, односно **HWE test type Locus by locus** (Слика 13.3).

Можно е да се изберат многу други опции, но нивниот избор треба да се направи со претходно јасна цел, за да не се зголеми времето на пресметување, да не се оптавари бројот на добиените резултати и да се добијат резултати кои тешко можат да се протолкуваат. На студентите не им се препорачува менување на опциите кои се дадени во оваа вежба.

По завршеното подесување за пресметување, се притиска на копчето **Start** и по определено време резултатите од анализата се готови. За да можеме да ги видиме добиените резултати, се притиска на копчето **View results** и на добиениот екран лево можеме да бираме кои резултати да ги видиме, а на десниот дел од екранот се прикажуваат резултатите (Слика 13.4).

Добиените резултати од алелската фреквенција на ХЛА-ДРБ1 локусот во македонската популација се внесуваат во Табела 13.1. Треба да се внесат најнапред добиените алели во првата колона и тоа почнувајќи од најмалиот број (0101 даден најдесно во резултатите) се до најголемиот број (1602). За секој алел се внесува во табелата неговата фреквенција, така што се множи со факторот 100, односно се поместуваат добиените

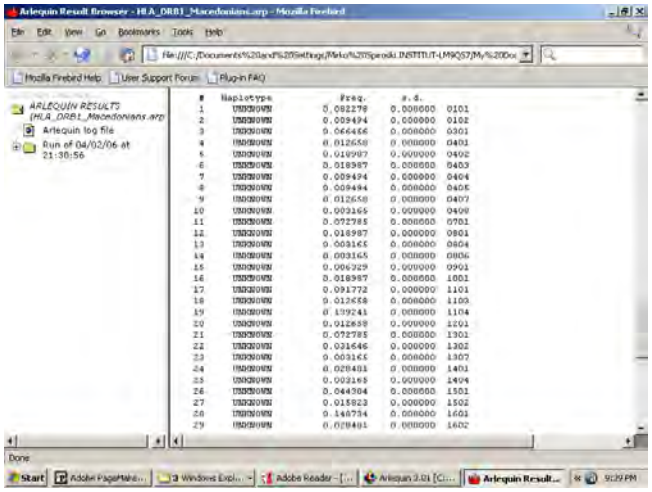


Слика 13.3: Избирање опции за подесување на пресметувањата за анализа на алелите (горе) и на Харди-Вајнберговата рамнотежа (долу) со компјутерскиот програм Arlequin (Отворање проект).

фреквенции за две децимални места надесно (пример, за алелот 0101 добиена е фреквенција од 0.082278, а во табелата се внесува резултат во проценти = 8.23 (се заокружува на две децимални места).

Внесување податоци од Харди-Вајнбергова рамнотежа:

Locus HLA-DRB1
#Genot _____
Obs.Heter. _____
Exp.Heter. _____
P. value _____
s.d. _____



Слика 13.4: Добиени резултати од алелската фреквенција на ХЛА-ДРБ1 локусот во македонската популација со компјутерскиот програм Arlequin.

Слика 13.1: Внесување резултати од алелска феквенција на ХЛА-ДРБ1 во македонската популација со компјутерскиот програм Arlequin.

Број на алел	ХЛА-ДРБ1 Алел	Фреквенција во проценти
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		

Дата _____

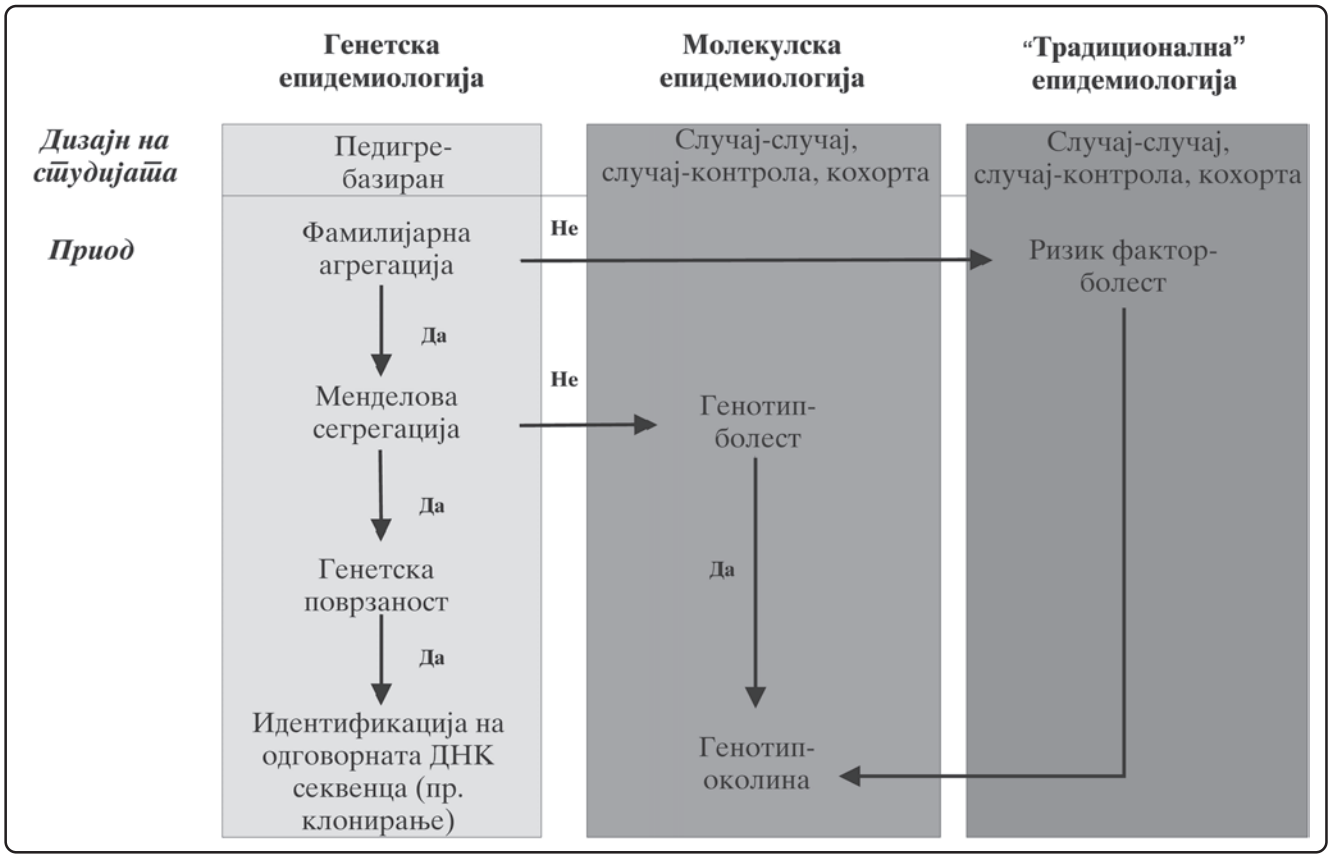
Студент _____

Асистент _____

ВЕЖБА 14: КВАНТИТАТИВНА ГЕНЕТИКА (ГЕНЕТСКА ЕПИДЕМИОЛОГИЈА)

14.1. Вовед

Класичната епидемиологија се бави со облиците на заболувања и факторите асоцирани со причините за заболување со крајна цел превенција на заболувањето. *Молекулската епидемиологија* го користи ДНК типизирањето за да го измери изложувањето (ДНК отстапување), раниот биолошки одговор (соматски мутации) и особините на домаќинот (генотип и фенотип) кои го овозможуваат одговорот кон надворешни материи. *Генетската епидемиологија*, како проширување на



Слика 14.1: Особеностите на традиционална, молекулска и генетска епидемиологија.

молекулската епидемиологија, е епидемиолошка евалуација на улогата на вродените причини за заболување во фамилиите и во популациите со задача да го открие наследниот облик на определено заболување, да го локализира генот и да најде обележувач здружен со прифатливоста за заболување.

Во генетската епидемиологија можеме да опишеме шест редоследни постапки:

Особености на болеста: Описна епидемиологија.

Фамилно групирање: Фамилни агрегациски студии.

Генетика или околина: Близнаци/посвоени/полунаследниц/миграции.

Начин на наследување: Сегрегациска анализа.

Локуси подложни на болест: Анализи на поврзување.

Обележувачи подложни на болест: Асоцијациски студии.

14.2. Особености на болеста: Описна епидемиологија

Автозомните рецесивни заболувања се обично чести во популации со висок степен крвно сродство (ограничен генетски пул). Примери за тоа имаме во: Тангиеровата болест, која се јавува на Тангиеровиот остров во Вирџинија, САД; многуте генетски заболувања кај евреите Ашкенези (Тај-Саксовата болест, Гошеовата болест, Фанкониевата анемија, Ниман-Пиковата болест); конгениталната адренална хиперплазија (САН) предизвикана од недостиг на ензимот 21-хидроксилаза во Јупик ескимите; конгениталната адренална хиперплазија (САН) предизвикана од недостиг на ензимот 11-бета хидроксилаза во мароканските Евреи; и таласемијата (бета и алфа) на Кипар и на Сардинија.

14.3. Фамилно групирање: Фамилни агрегациски студии

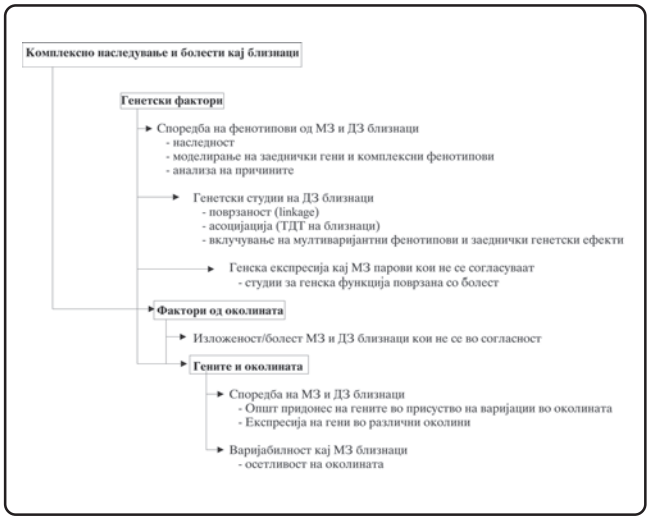
Кога е во парашање дали болеста има генетска компонента, втора стапка во приодот е да се открие ***фамилната агрегација*** (на пример, почеста појава кај децата или кај родителите). Тоа е веројатно веќе познато од описната (дескриптивната) епидемиологија.

Фамилната агрегација за некое заболување се мери со *релативен ризик за појавување* (RRR- relative recurrence risk) или *фамилни ризични односи* (FRRs – familial risk ratios). Овие величини се означуваат како λ_R, каде R (relationship) означува сродство (S=sibs - браќа/сестри; O=offspring- потомци, DZ= dizigotic twins - двозиготни близнаци). Нивната вредност го претставува ризикот роднините (од типот R) на заболените особи да заболат од даденото заболување, поделен со преваленцата кај дадената популација. Одредувањето на RRR за различни видови на роднини може да укаже на потенцијално постоење на повеќегенска основа (бекграунд) и неизразување/маскирање на некоја особина поради интеракциите на гените сместени на различни локации.

Примери за релативен ризик на појавување (ламбда):

Цистична фиброза: ризикот во наследниците = 0.20, ризикот во популацијата = 0.0004, ЛамбдаС = 500 (0.20/0.0004).

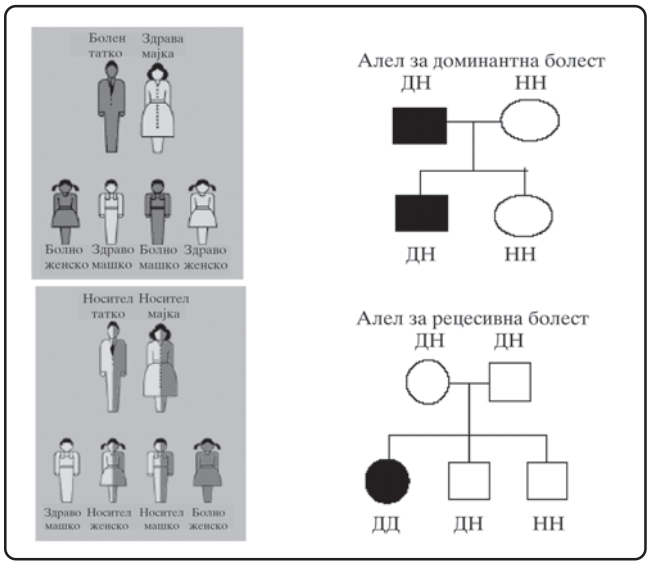
Хантингтонова болест: ризикот во наследниците = 0.50, ризикот во популацијата = 0.0001, ЛамбдаС = 5000 (0.50/0.0001).



Слика 14.2: Придонес на близнаците во истиување на комплексните особини и во заболувањата.

14.4. Генетика или околина: Близнаци/посвоени/полу-наследниц/миграции

Друг вид на традиционално употребуван дизајн на студии за разликување на генетските од негенетските врзани заболувања, се студиите кои се изведуваат на близнаци и на посвоени деца (Слика 14.2). Со помош на студиите во кои се вклучени близнаците се добиваат поспецифични информации од *релативниот ризик за појавување* (RRR). Преку споредба на монозиготните (МЗ) парови на близнаци (кај кои сите гени се идентични) со дизиготните (ДЗ) парови (каде само половината од гените се исти), се проценува улогата на гените во наследувањето на карактеристиките. Поголемата сличност кај МЗ близнаци е значаен доказ за постоењето и улогата на генетскиот фактор.



Слика 14.3: Сегрегациска анализа на доминантна и на рецесивна особина.

14.5. Начин на наследување: Сегрегациска анализа

Доколку се востанови постоење на генетски бијас, следниот чекор би бил дефинирање на начинот на наследување на соодветната карактеристрика/заболување или мапирање на специфичните ген(и) кои допринесуваат во тоа. Последново се постигнува со употреба на сегрегациските анализи кај фамилиите (Слика 14.3). Испитување на RRR внатре во фамилијата ќе ни даде неформален увид за можните видови на сегрегација. Сепак, за тестирање на хипотезата за постоење на влијанието на различни генетски фактори треба да се употребат други техники. На пример, дали на соодветната карактеристика/заболување влијае еден главен ген или повеќе гени имаат помал ефект? Дали постојат два главни гена кои со меѓусебната интеракција можат да доведат до варијации во карактеристиката/заболувањето? Одговор на ваквите прашања може да даде *сегрегациската анализа*. Таа е најкорисна при испитувањето на заболувањата кои се должат на еден ген со две различни алелни форми. Доколку во настанувањето на одредено заболување учествуваат мултипли локуси со мултипли алелни форми, сегрегациската анализа има помало значење.

Со сегрегациската анализа се проценува генетскиот модел на карактеристиките/заболувањата преку анализа на податоците добиени од повеќе генерации. Компонентите на генетскиот модел се:

1. *трансмисивната веројатност* (веројатноста дека со генотипот на родителите определен алел ќе се пренесе на потомството);

2. *пенетрантноста* за секој од генотиповите; и

3. *алелната фреквенција во популацијата* (за да се определат веројатностите за присутноста на најважните можни генотипови при разгледувањето на фенотиповите).

14.6. Локуси подложни на болест: Анализи на поврзување

Гените кои ја сочинуваат генетската компонента во етиологијата на едно заболување можат да бидат локализирани *студии на поврзаност* и *студии на асоцијација*. Доколку некој непознат локус лежи во основа на еден фенотип, а обележувачот кој се испитува е поврзан со него, тогаш кај родбинските парови (најчесто паровите браќа/сестри, но може и паровите внуци-чичковци/вујковци, баба/дедо-внуци, паровите полубраќа/сестри или паровите на први братучеди) кај кои постои совпаѓање за дадениот фенотип, ќе постои сличност и за генетскиот обележувач. За поголеми вредности на рекомби-

нантната фракција (θ) најдобро е да се испитуваат паровите баба/дедо-внуци, додека за мали вредности на RRR најдобро е да се испитуваат паровите браќа/сестри). Иако наизглед ваквото нешто личи лесно изведливо, испитувањето на паровите заболени-незаболени во основа е слаба стратегија. Во отсусто на поврзаност не постои причина сличноста помеѓу роднините да корелира со нивната сличност за генотипскиот обележувач. Студиите за поврзаност служат да ја тестираат ваквата корелација за сличноста помеѓу фенотипот и генетскиот маркер.

14.7. Обележувачи подложни на болест: Асоцијациски студии

Додека *рекомбинантната фракција* е основата на студиите на поврзаност, *неурамнотежената поврзаност* (LD) е основа на студиите за асоцијација. Претпоставката е дека генетскиот маркер кој го проучуваме е многу блиску до генот одговорен за заболувањето, што ќе има за резултат алелна асоцијација на популациско ниво. Друга важна претпоставка кај асоцијацијата и одредувањето на LD е дека постои многу мала алелна хетерогеност внатре во локусот. Големината на LD зависи од многу фактори. Доколку се претпостави дека се друго има подеднакво влијание, најважниот фактор кој ќе делува на големината на LD ќе биде природната/генетската дистанца помеѓу заболувањето и алелните маркери: колку се поблиску еден до друг, толку е помала фреквенцијата на рекомбинантноста и е поголема големината на LD. Ваквото нешто имплицира дека блиската поврзаност помеѓу маркерот и локусот одговорен за заболувањето ќе има за резултат поголеми периоди за LD внатре во популацијата. За да може да се открие постоење на LD поврзаноста немора да биде присутна. Подобар термин за објаснување на феноменот наречен LD е алелната или гаметната асоцијација.

Студиите за асоцијација се испитуваат на два начини: 1) Врз основа на популација (Контролите и случаите се од истата популациска база); и 2) Врз основа на фамилија (најчести се тројката родители и деца (мајка, татко, болно дете).

14.7.1. Статистичка анализа на асоцијација на алел со болест врз основа на популација

14.7.1.1. Зошто би се испитувала асоцијацијата со болестите?

Поврзаноста и асоцијацијата со болестите претставуваат двете главни полиња на интерес кога се зборува за учеството на гените во настанокот на некое заболување (или во дефинирање на фенотипот).

Големата етничка разноврсност која владее во светот бара голема внимателност при формирањето на групите кај кои ќе се извршуваат асоцијативните студии со цел да се избегне донесувањето на погрешни заклучоци за влијанието на одредени гени врз одредени заболувања кај одредени популации. Денеска се развиени голем број на софистицирани методи од страна на биостатистичарите и статистичарите кои се занимаваат со генетските истражувања, а се со цел правилно да се обработат податоците добиени од опширните студии за асоцијацијата на гените со болестите, особено оние кои имаат комплексна генетска основа.

14.7.1.2. Испитување значајноста

Доколку треба да се споредат две групи, неопходно е да се конструира 2x2 табела на веројатности (можности) за испитување на фреквенцијата на алелите. Ваквата табела е неопходна за испитување сигнификантноста, пресметувањето на релативниот ризик (relative risk, RR) или odds ratio (OR) и пресметувањето на интервалот на доверба (confidence interval, CI). Табелата на веројатности (можности) може да содржи и повеќе од два реда и две колони. 2x2 табела на веројатности (можности) е наједноставниот тип на табела која може да ни ги даде најосновните податоци за асоцијацијата на гените со болестите (Табела 14.1).

Бројот во секоја од клетките ја означува најдената фрекфенција, која што е искажана како не-негативен цел број. Секој испитуван примерок смее да се појави во само една, и не повеќе од една, клетка. Во овој тип на табели замената на местата помеѓу редовите и колоните не влијае на резултатот. Доколку табела на веројатности (можности) е предмет на тестирање на хипотеза, нулта хипотезата значи дека не постои никаква асоцијација помеѓу двете варијабли, додека

Табела 14.1: Четвороделна табела за испитување значајност на асоцијација на алели со болести.

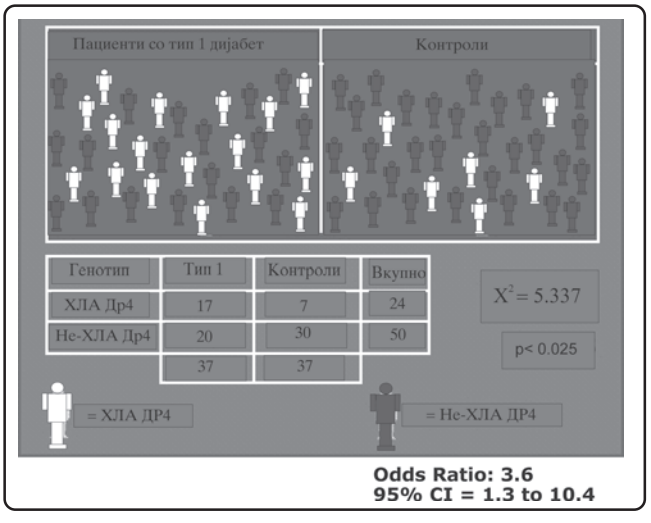
		АЛЕЛ *и*		*Вкупно редови*
		Присутен (+)	**Отсутен (-)**	
АЛЕЛ *j*	**Присутен (+)**	**a (+/+)**	**b (+/-)**	**a+b**
	Отсутен (-)	**c (-/+)**	**d (-/-)**	**c+d**
Вкупно колони		**a+c**	**b+d**	**N=a+b+c+d**

алтернативата означува дека постои асоцијација од било кој вид (двестран тест).

За да се изврши тестирање на хипотезата, неопходно е најпрвин да се пресметаат очекуваните фрекфенции за секоја клетка. Доколку се користи χ^2 тестот, сите очекувани фрекфенции треба да имаат вредност од најмалку 1 (не смеат да имаат фрекфенција помала од 1) и најмалку 80% од нив мораат да имаат фрекфенција поголема од 5 (Cochran-ово правило). Ова значи дека за 2x2 табела на веројатности (можности) сите очекувани фрекфенции мора да бидат поголеми од 5.

14.7.1.3. Тестови за испитување на значајност

Најчестите статистички испитувања кои се применуваатв во полето на генетиката при споредбата на две независни вредности (p_1, p_2) се користат χ^2 тест, Z-тест за два примерока, G-тестот и Фишеровиот тест на егзактност (Слика 14.4).



*Слика 14.4: Пресметување асоцијација помеѓу ХЛА-ДРБ1*04 алелите и тип 1 шекерна болест со хи квадрат тестот (χ^2).*

14.7.1.4. Одредување интервал на доверба (confidence interval - CI)

Кога една вредност (пропорција или OR добиени од примерок) е добиена како резултат од пресметките на непозната вистинска вредност (која се однесува на популацијата од кој примерокот е земен), може да се пресмета интервал на доверба. CI ни кажува многу повеќе одколку обичното тестирање на хипотезата, кога нултата хипотеза треба да се прифати или отфрли. При споредувањето на две групи, CI ни овозможува да видиме колкава може да биде разликата помеѓу нив, а не само дали се разликуваат од нула. Исто така ни покажува и дали статистички незначајните резултати ни дозволуваат веднаш да ја отфрлиме алтернативната хипотеза - непостоење на разлики (на пр. CI ја вклучуваат нулата и не ја достигнуваат критичната граница за постоењето на статистички значајна разлика) или постои некој резултат, кој најчесто поради неправилна евиденција, не ни овозможува донесување на билокаков заклучок (CI ја вклучува нулата, но исто така и ги надминува критичните вредности).

Кога на пример би се пресметал на ниво од 95% (како што и вообичаено се пресметува), тоа би значело дека во 5 % од времето испитуваниот параметар не би се појавил во интервалот пресметан за примерокот. Или технички кажано, тоа значи дека 95% од испитаниците од една популација ќе го имаат испитуваниот параметар во дадениот интервал. На некој начин, ова претставува прифаќање на фактот дека различни примероци од една иста популација можат да дадат различни резултати.

Широчината на CI исто така ни укажува колку всушност незнаеме за испитуваниот параметар кај популацијата (на пример средната вредност). CI вообичаено се пресметува за средната вредност (или за една одредена величина), за разликите помеѓу две средни вредности, за релативниот ризик или OR. Многу широк интервал би ни укажал на потребата да се зголеми големината на примерокот за да се постигнат веродостојни заклучоци за испитуваниот параметар. Доколку при тестирањето на хипотезата се добијат значителни резултати на ниво од 5%, долната граница на 95% CI ќе биде поголема од 0 за разликите помеѓу двете испитувани средни вредност и поголема од 1.0 за релативниот ризик и OR.

Пресметување интервалот на доверба. Вообичаено, при било која статистичка операција кај која има нормална дистрибуција на примероците (како на

пример кај разликите помеѓу средните вредност или самите величини), CI се конструира со додавање или одземање на вредностите на стандардната грешка од добиената вредност на испитуваниот параметар. Така 95%CI е даден со формулата:

статистичка вредност ± 1.96 SE

каде SE осначува стандардна грешка (standard error - SE) за соодветната статистички добиена вредност, а 1.96 ја претставува критичната Z вредност (Z_c) при P=0.05 (или 2.58 за 99%CI). Вредноста на Z_c не зависи од големината на примерокот.

14.7.1.5. Пресметување релативен ризик (relative risk-RR)/odds ratio (OR)

Пресметувањето на RR кој што е поврзан со одредени ХЛА гени/хаплотипови најчесто се прави според Woolf-овиот метод, модифициран од Haldane. Woolf релативната инциденца (relative incidence-RI) ја дефинирал како:

RI=ad/bc

(a, b, c, d се вредностите внесени во 2x2 табелата)

Woolf-овата формула за RR:

RR=(2a+1)(2d+1)/(2b+1(2c+1)

Во една 2x2 табела на веројатности (можности), бројот на лицата со соодветната карактеристика (алелот 1 во овој случај) кои ја имаат болеста е a/(a+c), додека бројот на лицата кои ја немаат соодветната карактеристика е b/(b+d). Соодветно на тоа ризикот за заболување на лицата со соодветната карактеристика би изнесувал (a/(a+c))/(b/(b+d), што значи дека:

RR=a(b+d)/b(a+c)

За малите вредности a и b во споредба со d и c, вредноста ad/bc (што всушност претставува OR) е приближна.

14.7.2. Статистичка анализа на асоцијација на алел со болест врз основа на фамилни податоци

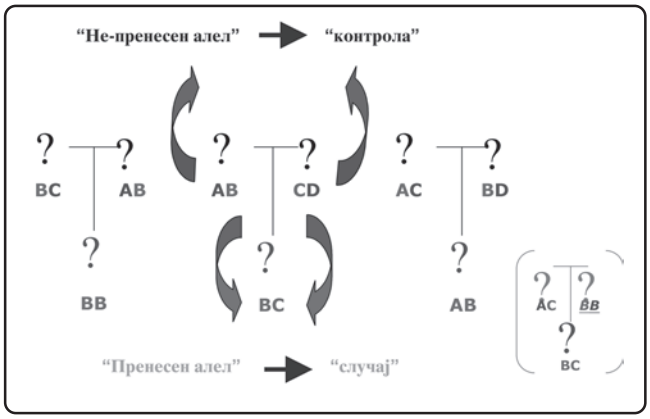
Во фамилно-заснованите асоцијациски студии спаѓаат:

а) Методот на хаплотипен релативен ризик (ХРР) (haplotype relative risk - HRR);

б) Методот на фамилно-засновани заболени контроли (affected family-based controls -AFBAC); и

в) Тест на неурамнотежено/извртено пренесување (transmission disequilibrium/distorsion test - TDT).

TDT е многу добар при стратификацијата на популацијата и може да се употребува кај фамилиите кај кои се изведуваат анализите за поврзаност. Послаб е од анализите контрола-случај, бидејќи за набљудување на еден ист ефект бара за 1/3 повеќе испитаници. Исто така може да биде и непогоден за изучување на болестите кои се јавуваат подоцна во животот. Овој тест бил развиен за споредба на бројот на алелите кои се пренесуват од хетерозиготните родители на заболените близнаци, при што како контрола за секоја заболена особа служеле незаболени близнаци (Слика 14.5). За ваков тип на дизајн, наместо незаболени близнаци, како псеудо-контроли (HRR методот) може да се употребуваат родителските хромозоми кои не се наследиле кај заболените деца. Вредноста на TDT тестот се зголемува при употребата на еволуциски-заснованите пристапи (ET-TDT) за хаплотипски анализи. Вистинската вредност на TDT може да се согледа кога стратификацијата на популацијата не може да се контролира. Бидејќи случаите и контролите во основа се исти лица (или нивните хромозоми), тие имаат иста етничка припадност. Дизајнот на TDT ја тестира нултата хипотеза дека не постои поврзаност и алелска асоцијација. Значајните резултати, кои можат да се јават во текот на тестирањето, се поради присутноста и на поврзаноста и на асоцијацијата. Како и стратификацијата на популацијата кај популациски-заснованите студии за асоцијацијата, промените во мејозата или извртувањата во соодносот на наследувањето можат да доведат до лажно-позитивни асоцијации кај TDT.

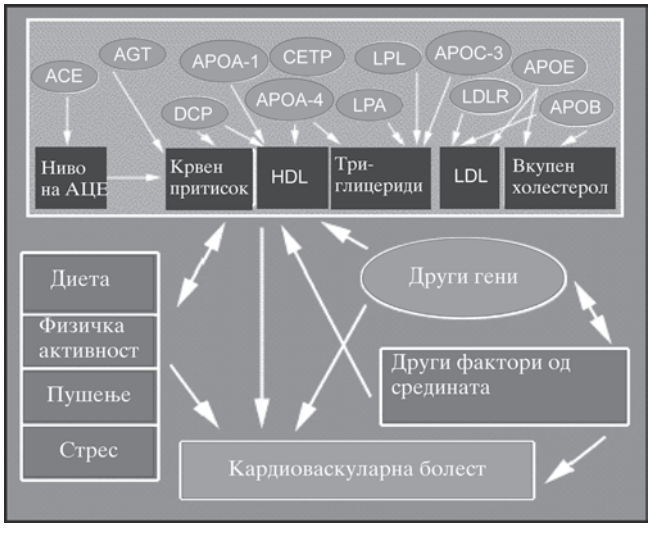


Слика 14.8: Принципот за пресметување тест на неурамнотежено/извртено пренесување (transmission disequilibrium/distorsion test - TDT).

14.7.3. Генетска епидемиологија на комплексните заболувања

Терминот комплексна карактеристика/заболување се однесува на секој фенотип, кој иако може да покажува фамилна тенденција (фамилно групирање, совпаѓање/конкорданца помеѓу роднините), не покажува класичен Менделов начин на наследување карактеристичен за еден ген. Контрастот помеѓу Менделовите заболувања и комплексните заболувања вклучува многу повеќе од јасниот односно нејасниот начин на наследување. Во обележјата на комплексното заболување се вклучени и познатите или сомнителните фактори од надворешната средина; сезонските фактори, редоследот на раѓање и ефектот на кохорта; доцната појава или појава на болеста во различна возраст; и различната прогресија на болеста. Многу од комплексните заболувања е тешко прецизно да се дијагностицираат. Дури и еден квантитативно лесно мерлив симптом, каква што е на пример хипертензијата, вклучува во себе голем број на грешки во мерењата. Конечните анализи на комплексните карактеристики бараат софистицирани статистички методи кои во себе ги вклучуваат сите генетски и не-генетски варијабли, нивните интеракции и фамилијарни корелации.

Кога неколку различни локуси учествуваат во формирањето на еден фенотип (како на пример кај комплексните заболувања), голема е веројатноста алелите кои се сместени во тие локуси да се среќаваат во популацијата со зголемена фреквенција. Доколку, на пример, 6 гени подеднакво учествуваат во настанување на заболувањето со инциденца од 1.5%, секој од прифатливите/податливите алели мора да се среќава во популацијата со фреквенција од 50% (Слика 14.6). Според тоа, генските варијанти со умерено/незначи-телно дејство кои се вклучени во полигенските заболувања, највероватно се нормални алели кои потекнуваат од несомнителни локуси, но имаат голема фреквенција. Поради ова, во медицинската генетика, е потребно да се познава нормалниот полиморфизам.



Слика 14.6: Сооднос на повеќефакторска генетска основа за кардиоваскуларните заболувања.

14.8. Задачи

14.8.1. Асоцијација на цитокинскиот полиморфизам со бронхијална астма врз основа на популација

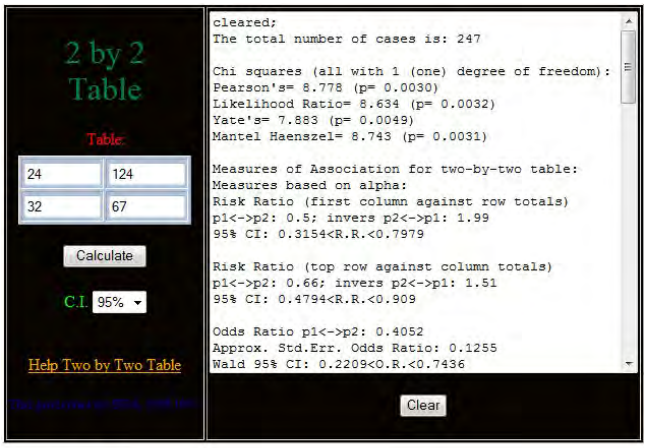
На Табела 14.2 се прикажани дел од резултатите од алелите на цитокинскиот полиморфизам во македонската популација и истите алели кај болни со бронхијална астма.

Табела 14.2: Табела за внесување резултати од испитување асоцијација на цитокинскиот полиморфизам на некои алели со бронхијална астма врз основа на популација.

Цитокински полиморфизам	Алел	Контрола			Бронхијална астма			Pearson's p	Odds ratio	(95% CI)
		Н	Има	Нема	Н	Има	Нема			
IL-1α -889	C	244	223		148	129				
	T	244	21		148	19				
IL-1β -511	C	250	162		148	100				
	T	250	88		148	48				
IL-1β +3962	C	250	171		148	109				
	T	250	79		148	39				
IL-1R pstI1970	C	250	161		148	91				
	T	250	89		148	57				
IL-1RA mspa111100	C	250	69		148	43				
	T	250	181		148	105				
IL-4Rα +1902	A	250	206		148	115				
	G	250	44		148	33				
IL-12B -1188	A	236	166		148	120				
	C	236	70		148	28				
IFNγ UTR5644	A	148	73		132	56				
	T	148	75		132	76				
TGF-β1 cdn10	C	212	108		148	67				
	T	212	104		148	81				
TGF-β1 cdn25	C	212	7		148	13				
	G	212	205		148	135				
TNF-α -308	A	250	33		148	11				
	G	250	217		148	137				

Студентите треба да пресметаат колку од испитаните немаат соодевтен алел кај контролните испитаници и кај испита-ниците со бронхијална астма и да ги внесат во Табела 14.2.

По внесувањето на податоците се вклучува програмот за пресметување на резултати од Табела 2x2, се внесуваат фреквенциите од алелите кои ги имаат и тие кои ги немаат, се притиска на копчето Пресметај (**Calculate**) и резултатите од десниот дел на екранот се внесуваат во табелата 14.2 за секој алел одделно (Слика 14.7). По завршената пресметка се бришат добиените резултати со копчето Бриши (**Clear**) и се продолжува понатаму (Слика 14.7).



Слика 14.7: Пресметување асоцијација на цитокинските алели кај болни од бронхијална астма со дводелната табела 2 x 2.

Со помош на асистентот се пренесуваат значајните асоцијации на алелите од цитокинскиот полиморфизам во делот на прифатливи (податливи) (**Susceptible**) или во заштитини (**Protective**) алели (Табела 14.3).

Табела 14.6: Табела за внесување резултати од прифатливи и заштитни алели од цитокинскиот полиморфизам кај болни со бронхијална астма.

Алели	Прифатливи (Suscebtible)				Заштитни (Protective)			
	Полиморфизам	p	Odds ratio	95% CI	Полиморфизам	p	Odds ratio	95% CI
Алел								

Дата _____ Студент _____ Асистент _____

ВЕЖБА 15: ЕВОЛУЦИСКА ГЕНЕТИКА

15.1. Вовед

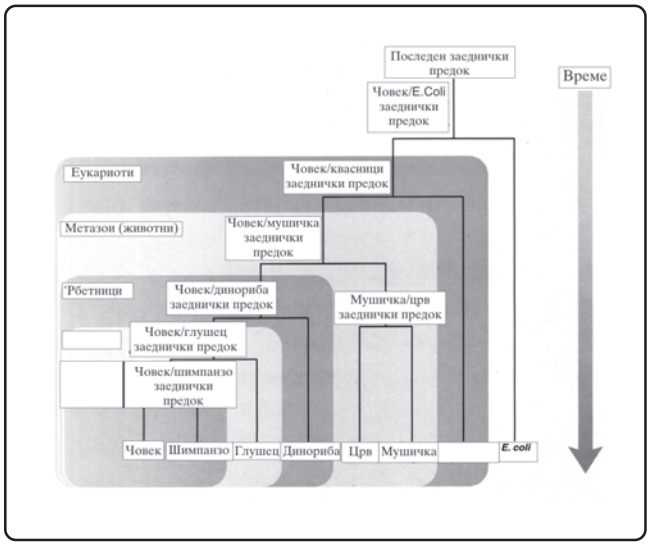
Еволуциската генетика истражува како еден човеков геном се разликува од другите, како и последиците од тие разлики за расветлувањето на човековиот вид во минатото и во сегашноста. Разликите помеѓу геномите ја создаваат основата за антрополошката, медицинската и судската генетика.

15.2. Потекло на видовите

Теоријата за еволуција на видовите базира врз два основни принципи: генетските варијации и природната селекција.

1. Генетски варијации. На ниво на вид генетските варијации се константна особина на природните популации. Фенотипските варијации од родителите се пренесуваат на наследниците. На микроеволуциско ниво генетските варијации се резултат од разликите во ДНК секвенците кои создаваат алели, промени во хромозомската структура и промена во бројот на хромозомите. Овие разлики ги предизвикуваат случајни мутации. Алтернативните алели можат да влијаат врз функцијата на протеините кои ги кодираат и оттука да влијаат врз фенотипот на организмот. Слично и промена на структурата на хромозомите и нивниот број, можат да влијаат врз генетското прикажување и оттука да влијаат врз фенотипот на единката.

2. Природна селекција. На ниво на вид најголем број од нив имаат многу повеќе наследници отколку што можат да преживеат и да се размножуваат. Ова предизвикува "*борба за опстанок*" која доведува до "*преживување на најприлагодливите*". Во тек на многу генерации, тие единки кои поседуваат најдобри особини ќе доминираат во популацијата. Краен резултат од природната селекција е да се создадат видови кои се подобро прилагодени на околината и/или се поефикасни за репродукција. На микроеволуциско ниво некои алели можат да кодираат протеини кои и овозможуваат на единката предност во селекцијата. Со тек на време, природната селекција може да ја смени алелската фреквенција на гените и оттука да доведе до фиксација на поволните алели, како и отстранување на неповолните алели.

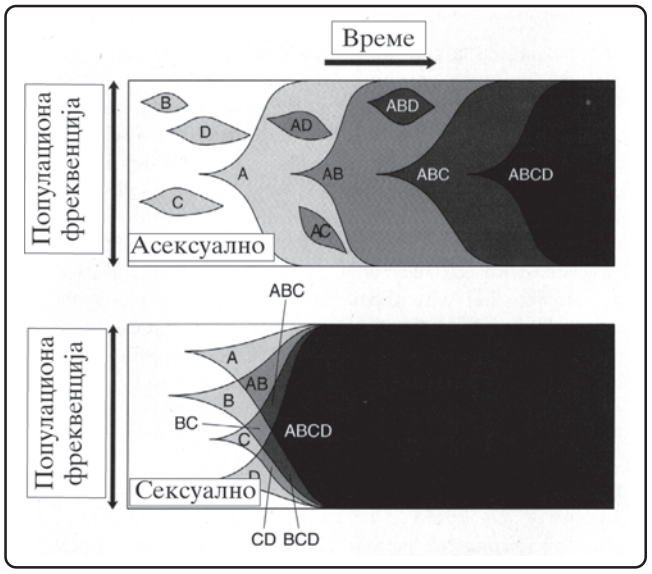


Слика 15.1: Филогенетско стебло на различни гранки од модерните видови кое покажува дека сите еднакво произлегле од нивниот заеднички предок во некое време.

15.3. Биолошки вид е група од репродуктивно изолирани единки

Биолошки вид се дефинира како група единки чии што членови имаат потенцијал да се парат (размножуваат) помеѓу себе во природата и да создаваат живи, плодни наследници, но кои не можат успешно да се парат со членови од друг вид.

Мејотичната рекомбинација е последица од сексуалното размножување и ја зголемува способноста на популацијата да се прилагоди на околината преку комбинирање на предностните алели во различни локуси. Наспроти тоа, видовите кои се размножуваат асексуално наследуваат нерекомбинирани делови од геномот и им е потребно значително подолго веме (низ последователни размножувања) да создадат најприлагодлив генотип (Слика 15.2).



Слика 15.2: Предностите на сексуалната репродукција. Сите четири алели (А-Д) ја зголемуваат способноста на организмот, со еднаква способност за секој алел. Кај асексуалните организми само еден алел може да преовладува во едно време, така што тие мораат да се комбинираат во серија. Во организмите со сексуална репродукција овие предностни алели можат да се комбинираат истовремено (паралелно). Тоа одзема помалку време за да се создаде најспособен генотип.

Постојат неколку различни патишта како да се постигне репродуктивна изолација (Табела 15.1). Тие можат да се класифицираат како предзиготни механизми кои спречуваат создавање на зигота, и послезиготни механизми кои спречуваат развој на жива единка откога ќе настане фертилизација. Репродуктивната изолација во природата може да се одбегне ако видот се чува во затвор. Во предзиготните механизми спаѓаат: живеалишната (хабитатната), временската (темпоралната), сексуалната, механичката и гаметната изолација. Додека во постзиготните изолации спаѓаат: хибридната безживотност, хибридната стерилност и хибридниот прекин.

Табела 15.1: Облици репродуктивна изолација помеѓу различни видови.

МЕХАНИЗАМ	ОПИС
Предзиготни механизми	
Живеалишна (хабитатна) изолација	Видот може да опфати различни живеалишта, така што тие никогаш не можат да дојдат меѓусебно во контакт.
Временска (темпорална) изолација	Видовите можат да имаат различно време на парење (сезона, време, ден) или да постанат сексуално зрели во рзлично време од годината.
Сексуална изолација	Сексуалната привлечност помеѓу машките и женските има ограничувања поради однесувањето, физиологијата или морфологијата.
Механичка изолација	Анатаомските структури на половите органи спречуваат парење помеѓу различни видови.
Гаметна изолација	Гаметниот пренос се случува (копулација), но гаметите не успеваат да се соединат една со друга. Ова може да настане бидејќи машките и женските гамети не успеваат да се привлечат, бидејќи не се способни да се обединат или бидејќи машките гамети не се живи во женскиот репродуктивен тракт од друг вид.
Послезиготни механизми	
Хибридна безживотност	Јајцето од еден вид се оплодува со спермиј од друг вид, но оплоденото јајце не може да ги продолжи раните ембрионални фази.
Хибридна стерилност	Меѓувидовиот хибрид преживува, но е стерилен. На пример, мазгата е вкрстување помеѓу женски коњ (кобила) и машко магаре, но не може да се оплодува.
Хибриден прекин	Првата генерација меѓувидов хибрид (Ф1) е жив и плоден, но следните генерации (Ф2 и следните) постануваат неспособни за живот.

15.4. Дивергентната еволуција може да биде алопатрична, парапатрична или симпатрична

Раздвојувањето на еден вид во два или повеќе различни видови е најчестиот вид на специјација (создавање нови видови). Зависно од географската локација на развиената популација, специјацијата се категоризира како алопатрична, парапатрична или симпатрична (Табела 15.2).

Табела 15.2: Општи генетски механизми кои доведуваат до алопатрична, парапатрична и симпатрична специјација.

ВИДОВИ СПЕЦИЈАЦИЈА	ЗАЕДНИЧКИ ГЕНЕТСКИ МЕХАНИЗМИ ОДГОВОРНИ ЗА СПЕЦИЈАЦИЈА
Алопатрична: две големи популации се одвоени со географски бариери	Мноштво мали генетски разлики можат да се насоберат во долг период од време, доведувајќи до репродуктивна изолација. Некои од овие генетски разлики можат да бидат прилагодливи (адаптивни), а други да бидат неутрални.
Алопатрична: мала основачка популација се одвојува од главната популација	Генетското поместување и свртување во прилагодливите врвови може да доведе до брзо создавање нови видови. Доколку групата се пресели во околина која се разликува од претходната околина, се очекува неутралната селекција да ги поттикнувакорисните алели и да ги отстрани штетните алели.
Парапатрична: две популации заземаат препокривачки граници така што се случува ограничен број крвно сродство	Новата комбинација од алели или хромозомско преуредување може да го ограничи количеството на генски проток помеѓу соседните популации поради многу малата способност за хибридни наследници.
Симпатрична: внатре во популацијата која залема едно живеалиште, се одвојува мала група во репродуктивно изолиран вид.	Ненадејна генетска промена доведува до репродуктивна изолација. Например, мутацијата може да влијае врз гаметното препознавање. Кај растенијата, создавањето полиплоидија често доведува до создавање нови видови, затоа што меѓувидовите хибриди (на пример диплоид х тертаплоид) е триплоид и стерилен.

15.5. Молекулска еволуција

Историски, морфолошките разлики помеѓу различните видови биле употребувани за конструирање еволуциски стебла во кои видовите кои биле слични едни на други се јавувале поблиску на стеблото. Дополнително, видовите биле категоризирани врз основа на разликите во физиологијата, биохемијата, па дури во однесувањето. Но, бидејќи еволуцијата се базира врз генетските промени, логично е видовите да се категоризираат врз основа на нивните особини од генетскиот материјал (на пример нивните генотипови). Тие видови кои се еволуциски поблиску се очекува да имаат повеќе сличности во нивниот генетски материјал отколку подалечните видови.

Предноста на молекуларниот приод во анализирањето на генетскиот материјал и генетските продукти направи револуција во полето на еволуцијата. Во минатите неколку декади, молекулската генетика зазеде доминантна улога во расветлување на специјацијата и еволуцијата. Разликите во нуклеотидните секвенци се квантитативни и можат да се анализираат со користење на математичките принципи и со помош на компјутерски програми. Еволуциските промени на ниво на ДНК можат објективно да се споредуваат помеѓу различни видови за да се утврдат еволуциските соодноси. Ваков приод може да се употреби за споредба на било кои постоечки организми, независно од тоа колку многу се разликуваат во нивните морфолошки особини. На пример, ние можеме да споредуваме ДНК секвенци помеѓу луѓето и бактериите, или помеѓу растенијата и винските мушички. Ваквите споредби не се возможни, или се многу тешки со употреба на морфолошките особини.

Постојат повеќе начини за споредување на генетскиот материјал и генските продукти кај различните видови. На Табела 15.3 се дадени најчестите молекулски методи кои ги користат генетичарите за да ги испитаат еволуциските соодноси. На ниво на ДНК можат да се користат методите за секвенционирање на ДНК, хибридизација, рестриктивно мапирање и цитогентски анализи. Во делот на ниво на протеини ни стојат на располагање методи за дедукција на амино киселините, како и имунолошки методи.

Табела 15.3: Експериментални приоди кои се користат за споредба на видовите на молекулско ниво.

ТЕХНИКА	ОБЈАСНУВАЊЕ
Ниво на ДНК	
Секвенционирање на ДНК	Степенот на сличност и разлики помеѓу ДНК секвенците се користат за утврдување еволуциски соодноси (види *Вежба 10. Автоматско флуоресцентно секвенционирање на ДНК*). Овој приод, заедно со анализа на дедуктивните амино киселинските секвенци на структурните гени, е најчесто користен метод и истовремено најпрецизен метод.
Хибридизација	Генетскиот материјал од два различни видови се хибридизира (види *Вежба 7. Метод на реверзна хибридизација*). Брзината на хибридизација ќе биде побрза кај поблиските видови.
Рестрикциско мапирање	Сегментите од ДНК се изолираат од различни видови и се подложуваат на рестриктивно мапирање (види *Вежба5. Должински полиморфизам на рестрикциски фрагменти (ДПРФ)*). Поблиските видови ќе имаат послични рестрикциски мапи.
Цитогенетска анализа	Хромозомите од различни видови се анализираат микроскопски. Поблиските видови ќе имаат идентичен или сличен број хромозоми и облик на лентите.
Ниво на протеини	
Дедукција на амино киселини	Технички е многу полесно да се направи ДНК секвенционирање отколку секвенционирање на амино киселини. Поради тоа, за да се определи амино киселинската секвенца на еден протеин, се определува кодирачкото подрачје на еден структурен ген, а амино киселинската секвенца се дедуцира со употреба на генетскиот код. Амино киселинскиот состав на некој протеин ќе биде посличен помеѓу блиски видови.
Имунолошки методи	Противтелата кои препознаваат специфични макромолекули, обично врз површината на клетките, се испитуваат кај различни видови. Противтелата кои препознаваат макромолекули од еден вид, често ќе препознаат блиски видови, но не и различни видови.

15.5.1. Хомологните гени настануваат од заеднички претходен ген

За два гени велиме дека се ***хомологни*** доколку тие произлегуваат од ист претходен ген. Гените можат да прикажат ***меѓувидова хомологност*** и ***внатревидова хомологност***. Меѓувидовата хомологија се случува поради удвојување на гените. Во ретки случаи, нееднаквото вкрстување може да додаде дополнителна копија од еден ген во хромозомот. Со време, можат да се насоберат две или повеќе мутации кои можат да доведат до разделување на нивните секвенци.

15.5.2. Варијациите во генските секвенци и конструирање филогенетски стебла

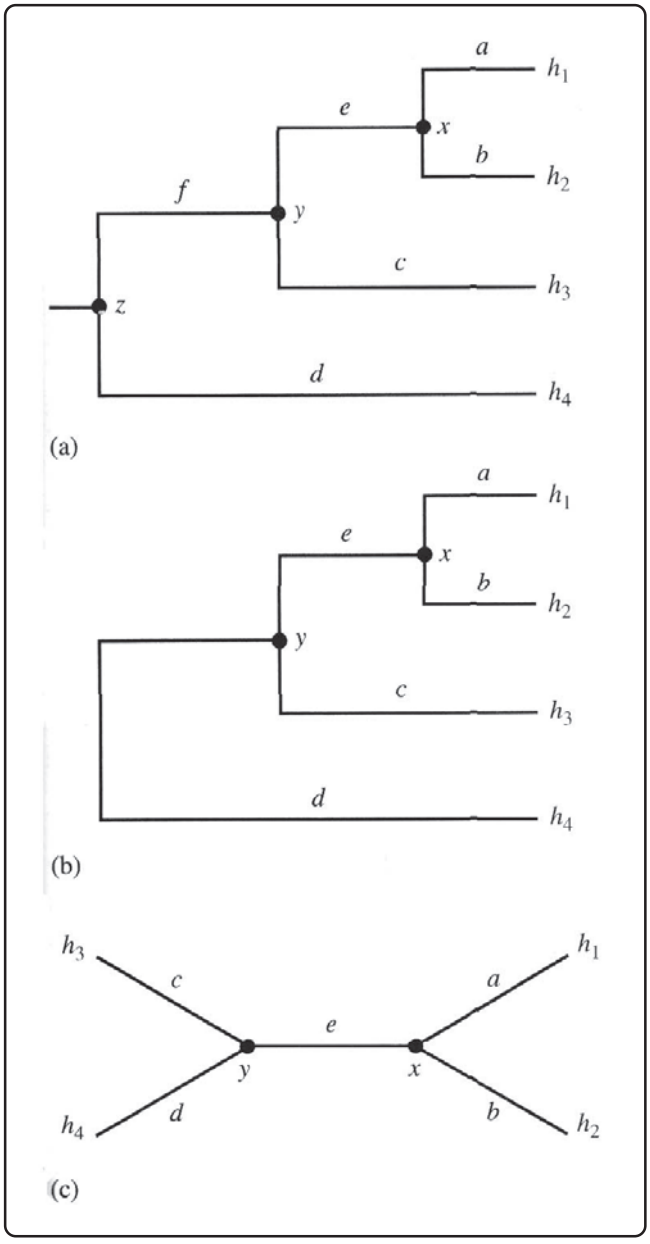
Филогенетско стебло е дијаграм кој ги опишува еволуциските соодноси помеѓу различни видови. Нуклеотидните и амино киселинските секвенци се особено погодни за конструирање еволуциски стебла, бидејќи генетските секвенци се менуваат во тек на многу генерации поради насобирање на мутациите. Оттука, кога споредуваме хомологни гени кај различни организми, ДНК секвенците од најблиските организми се послични една со друга отколку секвенците од далечни видови.

Во тој смисол, релативно константното јавување на неутрална мутација дејствува како "***молекулски часовник***" од кој се мери еволуциското време. Според оваа идеја, неутралните мутации ќе бидат заменети во просечно време еднакво со времето на мутацијата во една генерација. Врз оваа основа, генетското разделување помеѓу видовите, кое настанува поради неутрални мутации, го означува времето поминато од нивниот заеднички претходник.

Општо земено, гените кои бавно се менуваат (како што е генот за кодирање на рРНК) се корисни за испитување на далечни еволуциски соодноси и во испитувањето на еволуциските соодноси помеѓу бактериските видови кои се појавуваат доста често заради нивното кратко време на размножување. Наспроти тоа, гените кои брзо се менуваат (како што се гените за митохондријалната ДНК) се користат за откривање на понови еволуциски соодноси, особено помеѓу еукариотските видови кои имаат долг животен век.

15.5.2.1. Основни концепти за генетски стебла

Слика 15.3 прикажува едноставни генски стебла. Постојат три основни делови од стеблото: крајна точка, внатрешни јазли и должина на гранка. Крајните точки од h1 до h4 ги прикажуваат испитуваните хаплотипи (секвенци). Крајните точки понекогаш се наречуваат ***надворешни јазли***. Овие секвенци можат да настанат од различни таксономски групи (видови, родови и слично), различни популации од истиот вид, или од различни единки во истата популација. Бидејќи филогенетските дрва можат да се конструираат врз основа ни било кој од нив, ние ги викаме овие надворешни јазли операциски таксономски единици (**operational taxonomic units - OTUs**). ***Внатрешни јазли*** се точките на

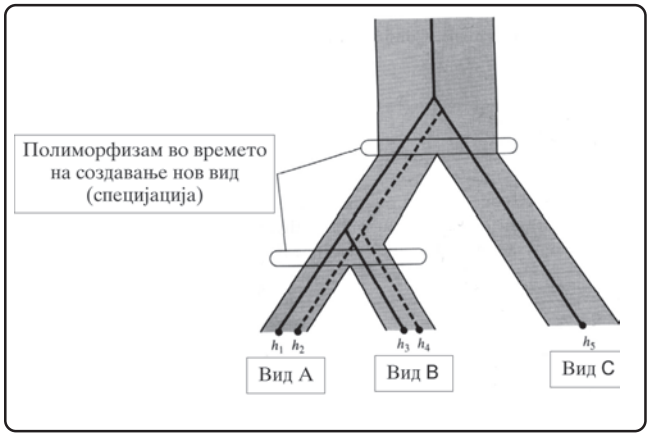


Слика 15.3: Трите начини да се нацрта генско стебло. а) коренесто стебло; б) и ц) се идентични безкоренести стебла. Примероците од секвенците (хаплотипови) се означени h1-h4; внатрешните јазли се x, y и z; должината на гранките се означува со a-e.

двоење на гранките. ***Должина на гранки*** е мерка на еволуциската оддалеченост помеѓу еден внатрешен јазол и надворешен јазол, или помеѓу два внатрешни јазли.

Коренесто стебло е тоа што ги покажува сообносите низ времето. Коренестите стебла обично се цртаат со временско напредување од лево кон десно и се традиционални (најчести). Во коренестите стебла, внатрешните јазли ги прикажуваат најновите заеднички претходници (**most recent common ancestor = MRCA**) на сите хаплотипови поврзани со тој јазол и десно од него (под претпоставка дека времето тече од лево кон десно).

Наспроти тоа, ***безкоренести стебла*** покажуваат само сообноси помеѓу хаплотиповите, но не ги прикажуваат правците на еволуциските промени. Стеблата кои базираат врз молекулските податоци најчесто се цртаат како безкоренести стебла. Меѓутоа, безкоренестите стебла понекогаш се цртаат како да личат на коренести стебла (Слика 15.3.б) личи на коренесто стебло, но нема јазол помеѓу h4 и јазолот у).



Слика 15.4: Пример за тоа како полиморфизмот во време на специјација може да предизвика генското стебло да се разликува од стеблото на видовите.

15.5.2.2. Генски стебла и стебла на видови

Можеме да размислуваме за два облици филогенетски стебла. ***Стеблата на видовите*** покажуваат еволуциска историја на група сродни видови, на пример стеблото може да покаже сооднос помеѓу сите видови во еден род. Ние можеме да нацртаме стебла кои покажуваат сообноси помеѓу фамилиите, популациите или други групи. Основната идеја е дека ние покажуваме еволуциски сообноси помеѓу (формални или неформални) таксономски групи.

Наспроти тоа, ***генските стебла*** покажуваат само сообноси помеѓу различни ДНК секвенци. Ако споредуваме секвнеци од различни видови, генското стебло може, но не мора да соодветствува на дрвото на видовите. Главната причина за недостаток на соодветност е ДНК полиморфизмот во времето на специјацијата (создавањето нов вид). Доколку е популацијата полиморфна кога започнува специјацијата, последователната фиксација може да доведе некои хаплотипови од различните видови да бидат многу поблиски отколку хаплотиповите во други видови (Слика 15.4). Исенчаните полиња на Слика 15.4 покажуваат топологија на стеблото на видовите со две одвојувања на видови. Линиите внатре во видовите го прикажуваат претпоставеното генско дрво. Можеме да видиме дека хаплотиповите h1 и h2 (прекинати линии) се во видот А, иако е h1 поблиску до h3 од видот Б отколку што е h2 (Слика 15.4).

15.5.2.3. Конструкција на стебла

Постојат два основни методи за конструирање филогенетски стебла. ***Методите на оддалеченост (дистанца)*** (Distance methods) користат некои мерки за еволутивна оддалеченост помеѓу паровите од OTUs и конструираат дрво врз основа на тие дистанци. Методите на оддалеченост не ги користат директно податоците од секвенците, туку конструираат дрво врз основа на мерките на оддалеченост добиени од податоците со секвенционирање (или други методи за утврдување на секвенците). ***Методите за состојба на буквите*** (Character state methods) ги користат вистинските податоци од секвенците. Секое место во секвенцата се смета како буква и секоја буква може да има едно од четирите состојби, на пример А, Т, Г или Ц за секвенцата од ДНК. Методите за состојба на буквите се поефикасни од методите на оддалеченост бидејќи ги користат сите информации од секвенцата, меѓутоа се многу комплексни за анализа.

Конструирањето филогенетски стебла не може да се направи без помош од компјутер. Теоретската основа, познавањето на математичката заднина и деталното познавање на сите постапки е доста комплексно и е надвор од предвидената наставна програма за хумана генетика за студентите од Медицинскиот факултет. Постојат повеќе компјутерски програми за пресметување, од кои најкористени се програмите PHYLIP, PAUP, DISPAN, MEGA и други.

Методи на оддалеченост. Во методите на оддалеченост, најнапред се конструира матрица од набљудувани разлики помеѓу паровите на OTUs. Потоа користиме некои модели од еволутивните промени (на пример моделот на Jukes-Cantor) за да ги претвориме набљудуваните разлики во некои мерливи еволутивни оддалечености. Откога ќе ја направиме матрицата на еволутивни оддалечености помеѓу OTUs, ќе употре-

биме некој вид на кластерски алгоритам за да ги групираме OTUs. Двата најчести методи за нивно групирање се **UPGMA**, или методот на некорегирани групи парови со аритметички големини (unweighted pair group method with arithmetic means) и соединувањето по блискост (neighbor joing). Постојат и други методи за конструирање матрици на оддалеченоста, но сите методи имаат иста фундаментална слабост: тие базираат врз некои пресметани еволутивни оддалечености добиени од секвенците, но не ги користат секвенците директно. Но, затоа тие можат да се добијат брзо и ефикасно и можат да се применат на скоро сите компјутери. До неодамна тие беа единствениот начин за конструкција на филогенетските стебла.

Методи за состојба на букви. Најчестиот метод за реконструкција на генските стебла во методите за состојба на буквите е ***принципот на парсимонија***. Според овој принцип, најдобро стебло е тоа кое што бара најмали еволутивни промени за да му се припише на набљудуваниот хаплотип. Програмите кои го користат овој принцип го испитуваат одделно секое место во секвенцата.

15.5.3. Анализирање поранешна ДНК

Најголемиот дел од нашето знаење за молекулската еволуција доаѓа од анализа на ДНК примероците собрани од живите видови. Со користење на ваков приод ние можеме да ги претставиме предисториските промени кои довеле до развој на денешните секвенци од ДНК. Како алтернатива, можно е повремено да се добијат информации за ДНК од видови кои живееле во минатото. Првите вакви успешни постапки се направени во 1984 година на Универзитетот во Калифорнија (на исчезнат зебровиден вид од 1883 година) и на Универзитетот во Минхен (на една мумија стара 2000 години). Овие методи се нарекуваат *анализа на поранешна ДНК*. Поранешната ДНК треба да биде интактна колку е можно повеќе, а тоа може да се случи за ДНК примероци кои биле складирани на ниски температури или смален кислород од 50.000 до 100.000 години.

15.5.4. Генетски варијации со неутрални промени во генските секвенци

Ненеутрална мутација е таа мутација која што влијае врз фенотипот на еден организам и може да влијае врз природната селекција. Ненеутралната мутација може да има само незабележително влијание врз фенотипот на еден организам или таа може да има значителен ефект. Природната селекција одбира преживување на најприлагодените и оттука ги одржува корисните алели, а ги отстранува штетните алели. Поради тоа природната селекција е доминантната сила за менување на генетскиот состав на природните популации и доведува до варијации.

Во 1968 година Мото Кимура од Јапонија предложи ***неутрална теорија за еволуција***. Според оваа идеја, најголемиот број генетски варијации најдени во природните популации се резултат од насобрани неутрални мутации. ***Неутралните мутации*** не влијаат врз фенотипот на организмот, а врз неутралните алели не влијае природната селекција. На пример, мутација во структурниот ген кој го менува глицинскиот кодон од GGG во GGC нема да влијае врз амино киселинската секвенца на кодираниот протеин. Бидејќи неутралната мутација не влијае врз фенотипот, тие се рашируваат низ популацијата според нивната фреквенција и според генетското поместување. Оваа теорија е наречена "*преживување на најсреќниот*" и се наречува уште и не-Дарвинова еволуција наспроти Дарвиновата "*преживување на најприлагодените*".

Во 1974 година Кимура со неговите колеги предложиле пет принципи кои ја покриваат еволуцијата на гените на молекулско ниво:

1. За секој протеин брзината на еволуцијата, во облик на замена на амино киселина, е приближно константно со неутралната супституција која не влијае врз структурата и функцијата на протеините.

   Доказ: Како еден пример, количеството на генетски варијации помеѓу кодирачките секвенци на човековите гени за алфа-глобин и за бета-глобин се приближно еднакви како и разликите помеѓу гените за алфа-глобин и бета-глобин кај рибата крап. Овој вид на споредба важи за многу различни гени споредени кај многу различни видови.

2. Протеините кои се функционално помалку значајни за преживување на организмот, или делови од протеини кои се помалку важни за неговата функција, имаат тенденција побрзо да еволуираат отколку позначајните протеини или подрачјата од протеини. Со други зборови, за време на еволуцијата, помалку значајните протеини ќе насоберат многу побрзо амино киселински замени отколку значајните протеини.

   Доказ: Определени протеини се критички за преживување, а нивната структура исклучително влијае врз нивната функција. Како пример се хистонските протеини неопходни за нуклеозомското создавање кај еукариотите. Хистонските гени толерираат само неколку мутации и еволуирале исклучително бавно. За споредба, фибринопептидите, кои го фрзуваат фибриногенот да создаде

сосирок, еволуирале многу брзо. Веројатно, секвенцата на аминокиселините во овие полипептиди не се толку значајни за да овозможат агрегација и да создадат сосирок. Вториот пример се однесува на амино киселинските секвенци во ензимите. Познато е дека амино киселинска супституција е многу ретка во активното место (што е критично за нивната функција), но се многу почести во другите делови од протеинот.

3. Тие мутирани аминокиселини кои не ја менуваат постоечката структура и функција на протеинот (конзервативни супституции) се случуваат многу почесто во еволуцијата отколку нарушувачките промени на амино киселините.

Доказ: Кога се испитува брзината на промените во кодирачката секвенца во структурниот ген, нуклеотидните замени многу почесто се случуваат во колебливите бази отколку во првата или втората база во кодонот. Мутациите на колебливите бази се често тивки (не ја менуваат амино киселинската секвенца на протеините). Конзервативните супституции (на пример, слична неполарна амино киселинска супституција со друга неполарна мино киселина) се средно чести. За споредба, неконзервативните супституции се поретки, иако тие се случуваат. Нонсенс мутациите и мутациите со рамковно свртување се многу ретки во кодирачките секвенци од гените. Исто така, интронските секвенци се менуваат многу повеќе отколку егзонските секвенци.

4. Генската дупликација мора секогаш да им претходи на гените кои добиваат нова функција.

Доказ: Кога во еден вид постои само една копија на ген, тој обично има функционална улога слична на хомологниот ген кој се наоѓа во друг вид. Генските удвојувања (дупликации) создаваат генски фамилии во кои што секој член остварува малку поинаква функционална улога.

5. Селективното отстранување на дефинитивно штетни мутации и случајна фиксација на селективно неутралните или помалку штетните алели, се случува многу почесто во еволуцијата отколку фреквенцијата на Дарвиновата селекција на мутантите со дефинитивна предност.

Доказ: Тивките и конзервативните мутации се многу почести отколку неконзервативните супституции. Веројатно тие неконзервативни мутации имаат негативен ефект врз фенотипот, така што ефектно се отстрануваат од популацијата со природна селекција. Во ретки случаи, амино киселинските супституции поради мутации можат да имаат корисен ефект врз фенотипот. На пример, неконзервативна мутација на бета-глобинскиот генски продукт хемоглобин C (HC), кој и дава на единката отпорност кон болеста маларија, ако се наоѓа во хетерозиготна состојба.

ДНК секвенците од стотици илјади различни гени од илјадници видови ги поддржуваат овие пет принципи во генската еволуција на молекулско ниво. Меѓутоа, разликите не се разрешени. Има некои генетичари, наречени ***селекционисти***, кои се спротивставуваат на неутралистичката теорија. Без разлика на тоа, секоја школа ги прифаќа генетското поместување и природната селекција како клучни фактори во еволуцијата. Неутралистите тврдат дека најголемиот број генетски варијации произлегуваат од неутралните генетски мутации и од генетското поместување, додека селекционистите тврдат дека предностните мутации и природната селекција се примарни фактори.

15.5.5. Еволутивно менување на хромозомската структура и број

За видот на еволуцијата се значајни и генските удвојувања, инверзии, транслокации, како и промени во бројот на хромозомите. Промените во хромозомската структура и/или нивниот број не мора секогаш да бидат прилагодливи, туку можат да доведат до репродуктивна изолација и создавање нов вид.

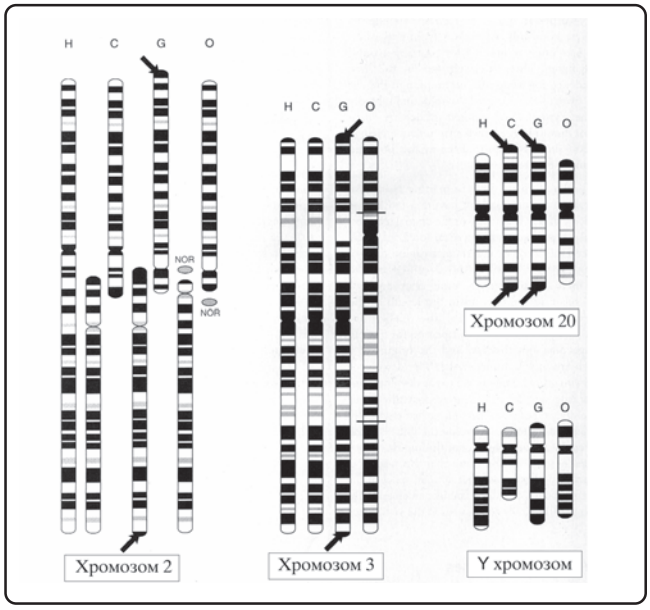
Кариотипите се корисни за филогенетски споредби поради неколку причини:

1. Тие се менуваат релативно бавно, бидејќи најголемиот број хромозоми се ограничени од потребата да се спарат со хомологните хромозоми, смалувајќи го нивното преуредување.

2. Тие повеќе овозможуваат "глобални" споредби на геномите, отколку специфични сегменти кои можат да бидат под влијание на определени селективни ефекти.

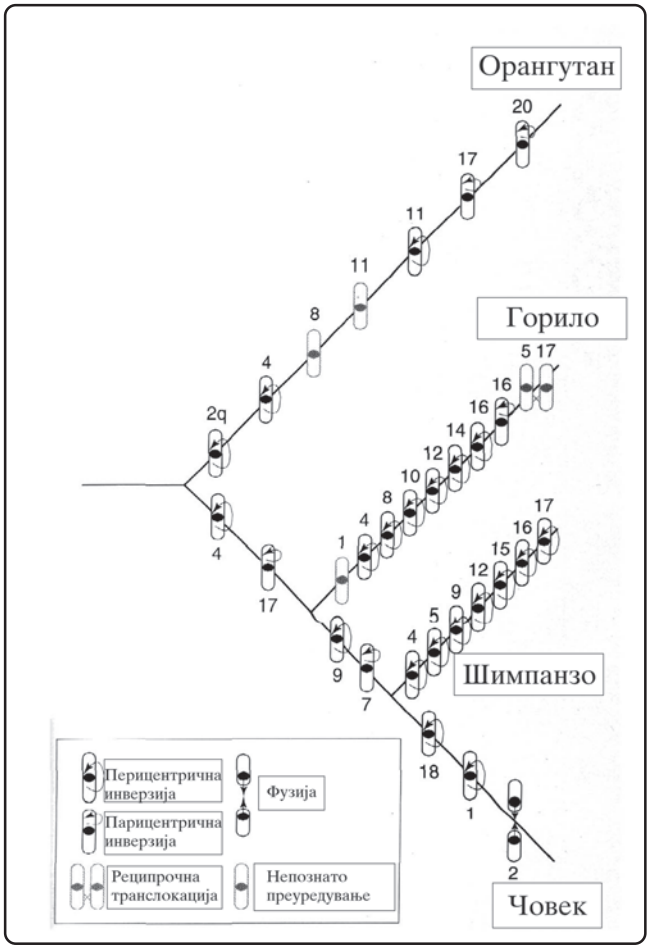
3. Методите за испитување се технички едноставни, бараат универзални реагенси и поради тоа се директно применливи за многу голем број видови.

Највидливата разлика помеѓу хромозомите од човекот и од големите мајмуни е нивниот број: додека луѓето имаат само 46 хромозоми, големите мајмуни имаат 48 хромозоми. Споредба на Г-бандираните кариотипи покажуваат многу висок степен на сличност помеѓу четирите видови, а покажуваат дека разликите во хромозомскиот број е резултат на очигледно соединување крај-со-крај на два мали хромозоми, кои се наоѓаат кај големите мајмуни, во еден голем хромозом 2 кај луѓето (Слика 15.5). Покрај овие разлики, постојат и други помали разлики.



Слика 15.5: Примери од хромозоми од човек и од големите шимпанза. Идеограми од Г-бандирани хромозми 2, 3, 20 и Ипсилон кај луѓето (Х), шимпанзо (Ц), горило (Г) и оран-гутан (О).

Врз основа на најдените разлики во кариотипот кај луѓето и големите мајмуни, можно е да се реконструира кариотипот на заедничкиот претходник и да се нацрта филогенетско стебло (Слика 15.6).



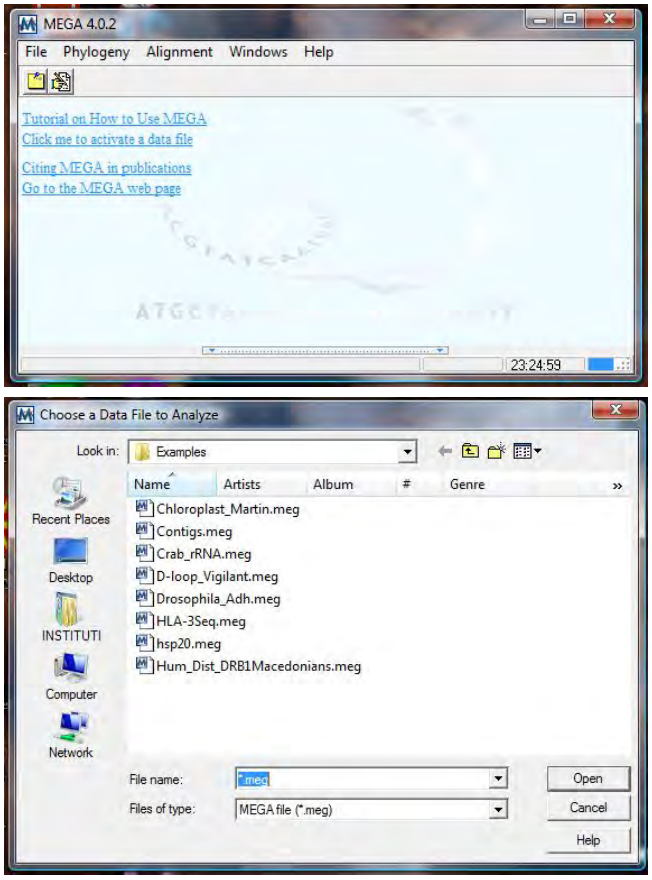
Слика 15.6: Филогенетско стебло на луѓето и големите мајмуни врз основа на кариотипските докази. Бројките над и под симболите ги означуваат вклучените хромозоми.

15.6. Задачи

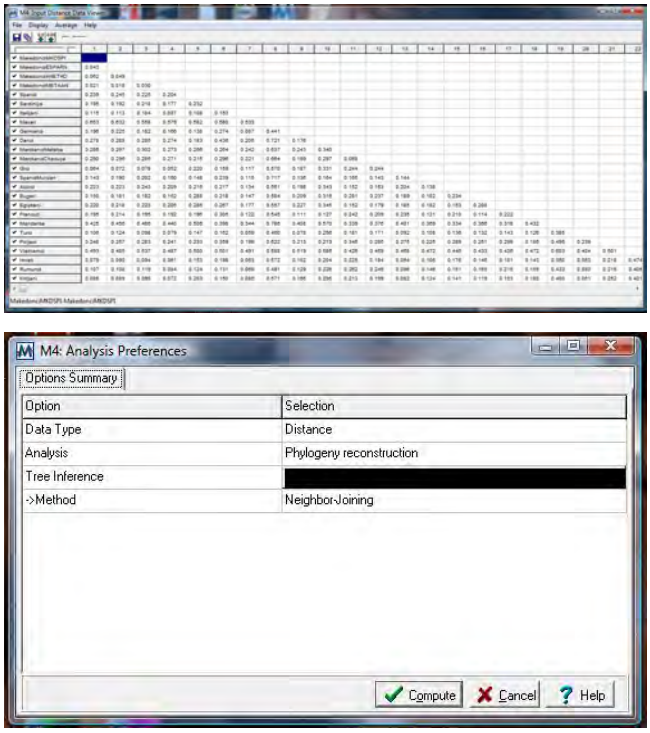
15.6.1. Пресметување филогенетско стебло на ХЛА-ДРБ1 локусот кај различни популации со методот на оддалеченост

За анализа на филогенетското стебло на ХЛА-ДРБ1 локусот (генот) кај различни популации го користиме програмот MEGA 3.1 (**Molecular Evolutionary Genetics Analyzis, version 3.1**). Програмот се активира со кликнување на иконата од екранот. Потоа се кликнува на линкот **Clik me to activate a data file,** од директориумот примери (**Examples**) се бира фајлот **Hum_dist_DRB1Macedonians.meg** и се кликнува на копчето отвори (**Open**) (Слика 15.7).

После тоа се отвора матрицата на оддалеченост, која сме ја добиле претходно со анализа на добиените фреквенции на алелите од ХЛА-ДРБ1 во македонската популација (прикажани во *Вежба 13. Популациска генетика*), внесување на фреквенциите од другите популации (објавени во литературата) и пропуштени низ компјутерскиот програм **DISPAN** (Слика 15.8, горе). Пресметувањето на матрицата на оддалеченост е надвор од наставната програма за хумана генетика за студентите по медицина на Медицинскиот факултет. Ако не се прикажат автоматски резултатите од матрицата на оддалеченостите, тогаш се оди на **Data -> Data Explorer** и се прикажуваат.



Слика 15.7: Влезниот екран (горе) и екранот за внесување матрица на генски оддалечености на ХЛА-ДРБ1 генот кај македонскста и другите популации (долу).



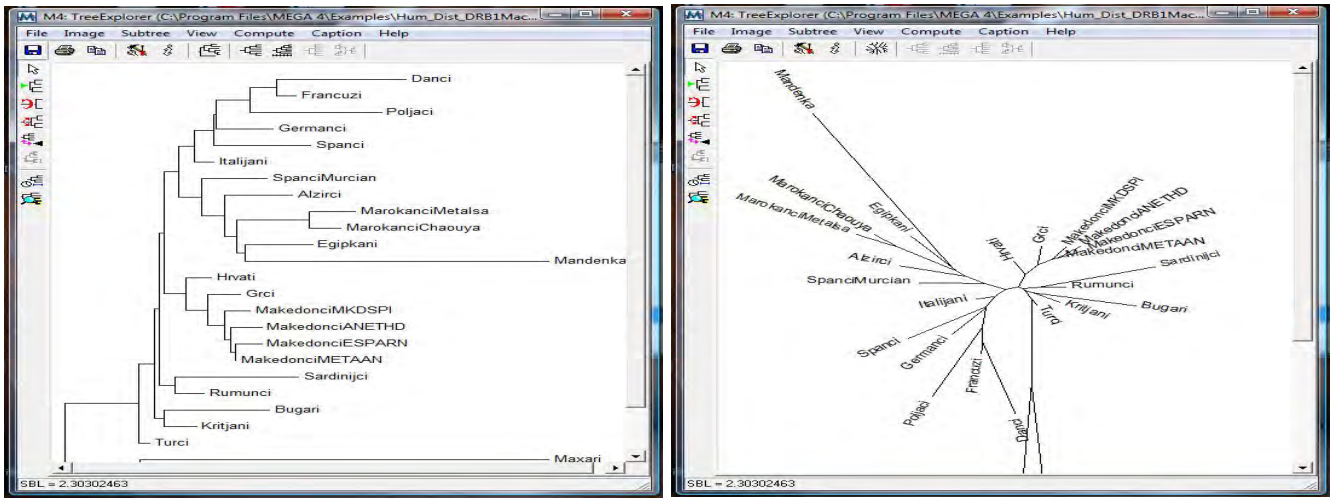
Слика 15.8: Матрицата на генетските оддалечености во ХЛА-ДРБ1 генот помеѓу македонската и другите популации (горе) и активирање на пресметувањето на филогенетското стебло (долу).

Пресметувањето на генетското стебло се остварува со кликнување на копчињата **Phylogeny -> Construct Phylogeny -> UPGMA** (или некој друг метод), се притиска на копчето **Compute** (Слика 15.8, долу) и се добива на екранот генетското стебло.

Генетското стебло може да се прикаже на повеќе начини (Слика 15.9):

1. Традиционално (**Traditional**) со три подваријанти.
   1.1. Правоаголно (**Rectangular**).
   1.2. Право (**Straight**).
   1.3. Искривено (**Curved**)
2. Ѕвезда (**Radiation**).
3. Круг (**Circle**).

Одберете еден вид, копирајте ја сликата со наредбите **Image -> Copy to Clipboard**, отворете го програмот **Word** и со наредбата **Paste** внесете ја сликата. Кликнете на сликата и со десното копче од глувчето активирајте ја наредбата **Format picture -> Size** и во височина (**Height**) не смее да биде поголема од 4 инчи, а во широчина (**Width**) не смее да биде поголема од 5 инчи. Потоа сликата се печати со наредбата **Print**, се сече и се лепи на Слика 15.10.



Слика 15.9: Филогенетското стебло може да се прикаже на неколку начини.

Слика 15.10: Место за лепење резултат до филогенетско стебло на ХЛА-ДРБ1 ген.

Дата Студент Асистент

_____ _____ _____

16: ОСНОВНИ ЛАБОРАТОРИСКИ ПРАВИЛА

1. За поефикасно да ги совладате практичните вежби, предвидената содржина научете ја пред доаѓање на вежби;
2. Не е дозволено заменување на вежбите (во исклучителни состојби консултирајте се со Шефот на катедрата);
3. Заштитна облека (мантил) мора да се носи за цело време на изведување на вежбите/експериментите;
4. Секој студент е одговорен за одржување на неговата уредна и средена работна површина;
5. Не фрлајте хартија, стакло или пластика во мијалниците;
6. Не користете мобилни телефони за време на изведувањето на практичната настава;
7. За оштетување на опрема или прекумерно трошење на реагенси ќе се наплаќа соодветен паричен надоместок.

Безбедоноста е ваша основна грижа за време на вашиот престој во лабораториите, затоа земете ги во предвид следниве препораки:

1. Биолошките примероци кои се користат во лабораториските тестови (на пр. крв) треба секогаш да се третираат како потенцијално инфективни. Примероците од високо ризични пациенти се посебно означени и се работат во издвоени работни површини.
2. Директно изложување на ултравиолетно светло може да доведе до акутно оштетување на ретината од 30 минути до 24 часа по изложувањето. Затоа УВ светлото секогаш се гледа преку соодветно заштитно стакло;
3. Не јадете, не пијте и не пушете во лабораториите;
4. Не работете во лабораториите, освен во времето предвидено за изведување на вежби;
5. Не внесувајте посетители во лабораториите без претходна дозвола на наставниците;
6. Не пробувајте да правите експерименти кои не се предвидени. За било какви модификации во работата, претходно побарајте дозвола од наставникот;
7. Не трчајте низ лабораториите.

Кога работите со хемикалии:

8. Не пипетирајте со уста, секогаш користете пипетори со продолжетоци за една употреба;
9. Секогаш носете заштитни ракавици и избегнувајте контакт на кожата со реагенсите, контролните примероци или примероците за испитување;
10. Никогаш не додавајте вода на концентрирани бази или киселини;
11. Никогаш не мешајте концентрирани бази и киселини;
12. Никогаш не истурајте запаливи супстанции во близина на пламен;
13. Никогаш не враќајте користен реагенс во ново шишенце.

Во случај на несреќа:

14. За било каков инцидент (дури и истурање неколку капки од некој реагенс) веднаш известете го вашиот наставник.

ЛИТЕРАТУРА

Ohta T, Aoki K. Population Genetics and Molecular Evolution. Lapan Scientific Societies Press: Tokio, 1985.

Brown TA. Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Volume 1. IRL Press: Oxford, 1991.

Brown TA. Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Volume 2. IRL Press: Oxford, 1991.

Mathew CG. Methods in Molecular Biology. Protocols in Human Molecular Genetics. Humana Press: Clifton, 1991.

Westermeier R. Electrophoresis in Practice. A Wiley Company: Weinheim, 1997.

Hildebrandt F, Igarashi P. Techniques in Molecular Medicine. Springer: Berlin, 1999.

Nicholl DST. An Introduction to Genetic Engineering. Cambridge Universisty Press: Cambridge, 2002.

Hill WE. Genetic Engineering. Taylor and Francis: London, 2002.

Тодорова Б, Алабаковска Ј, Босилкова Г, Коренти П, Крстевска М, Лабудовиќ Д, Тошеска-Трајковска К, Трајковска С, Цековска С, Цекова-Стојкова С. Практикум по биохемија за студенти по медицина. Институт за медицинска и експериментален биохемија: Скопје, 2003.

Трајковски В. Практикум по хумана генетика. Филозофски факултет, Институт за дефектологија: Скопје, 2003.

Halliburton R. Introduction to Population Genetics. Pearson Prentice Hall: Upper Saddle River, 2004.

Jobling MA, Hurles M, Tyler-Smith C. Human Evolutionary Genetics. Garland Science: New York, 2004.

Brooker RJ. Genetics Analysis & Principles. *The McGraw Hill Companies:* 2004.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Molecular Biology of the Gene. Pearson Benjamin Cummings: San Francisco, 2004.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuji DT, Miller JH. Introduction to Genetic Analyzis. Freeman and Co.: New York, 2005.